

紫云英根瘤菌结瘤基因调控片段克隆和分析^{*}

农 广¹⁾ 张忠明²⁾ 胡福荣²⁾ 陈华癸²⁾

(1) 中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275;

2) 农业部华中农业大学农业微生物重点开放实验室)

摘 要 通过对紫云英根瘤菌 7653R及其 *Nod⁻* 突变株 7653R-1 侵染根毛试验证实, 7653R 菌株 318 $\times 10^3$ bp 大质粒决定早期结瘤功能, 分子杂交结果显示, 其 *nodDABC* 定位于该质粒上. 将 7653R 菌株的大质粒 DNA 进行酶切并克隆到表达载体 pM P220 上, 构建 *lacZ* 重组子文库, 将 *lacZ* 重组子文库导入 7653R 菌株, 在加有 X-gal 和种子浸提物的根瘤菌培养基上选择蓝色菌落. 通过 Miller 试验测定它们的 β 半乳糖苷酶活性, 获得 1 株种子浸提物对其有诱导效应的菌株 HN18, 对该菌株所含的重组质粒 pHN18 进行 *nodDABC* 探针杂交, 发现有 1 条 1.7×10^3 bp 的阳性杂交带, 说明在 pHN18 中克隆有结瘤基因启动子.

关键词 紫云英根瘤菌, *nod* 基因, 分子杂交, *lacZ* 基因

分类号 Q 78

根瘤菌的共生结瘤作用涉及到其基因组中的数十个基因, 早期的结瘤作用则与调节基因 *nodD* 和共生结瘤基因 *nodABC* 有关, *nodABC* 的表达需要 *NodD* 蛋白和植物根系分泌物的存在, 根系分泌物中起诱导作用的是黄酮类物质. 关于紫云英根瘤菌结瘤基因的研究报道不多, 有报道提到 *nod* 基因定位于内源质粒上^[1~3], 并且通过构建基因文库筛选到具有互补结瘤功能的重组质粒^[4,5], 但都未涉及到结瘤基因的表达和调控. 本研究利用表达型载体 pM P220 及结瘤基因诱导物 (寄主植物种子浸提物) 直接克隆和筛选具有调控结瘤基因表达活性的片段, 以研究根瘤菌与寄主植物相互作用的分子机理.

1 材料和方法

1.1 供试菌株 质粒和培养基

供试菌株和质粒见表 1. 大肠杆菌培养用 LB 培养基, 根瘤菌用 SM S40 培养基, 紫云英植株用 Jensen 无氮培养基.

1.2 侵染根毛测试

紫云英种子经酒精和 $w=0.1\%$ 升汞表面消毒, 无菌水洗涤 6 次后, 在 28°C 萌发 2 d 至胚根长出, 移植于加有 Jensen 无氮培养基的软琼脂载玻片上, 在 $16\sim 26^{\circ}\text{C}$ 培养, 每天光照 12 h, 待 2 片子叶张开, 感染根瘤菌, 1 d 后开始观察根毛形态的变化. 对空白对照 感染

^{*} 国家攀登计划“共生体系中最佳结瘤固氮模型控制的研究”资助项目

收稿日期: 1997-06-23 农 广, 男, 34 岁, 讲师

7653R和 7653R-1的植株进行根毛变形测试,连续观察 5 d,每天 2次,每次 3个植株,统计所观察根毛的变形状况.

1.3 *nod* 探针杂交

使用宝灵曼公司的地高辛标记和检测盒进行杂交分析,并按所附说明书进行操作.

1.4 *lacZ*重组子文库的构建和三亲转移接合子的筛选

按文献 [6] 方法提取根瘤菌大质粒, *Eco*RI 酶切 2 h,将 DNA片段与启动子缺失载体 pMP220连接,连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 中,在含 Tc (10 μ g/mL) 的 LB平板上筛选抗性菌落,从而获得 7653R大质粒的 *lacZ*重组子文库.以 *lacZ*重组子文库为供体,根瘤菌 7653R菌株为受体,在具有 *tra*⁺ 功能的 pRK2013质粒的协助下,通过三亲本杂交将 *mob*⁺ *tra*⁻ 的 *lacZ*重组子导入到 7653R菌株中.在加有 X-gal (100 μ g/mL)、植物种子浸提物 (20 μ L/mL)、Sm (100 μ g/mL) 和 Tc (10 μ g/mL) 的 SM上筛选蓝色菌落.

表 1 实验菌株和质粒

Tab. 1 Experimental bacterial strains and plasmids

菌株与质粒		相关性状	菌株与质粒		相关性状
<i>R. huakuii</i>			<i>R. fredii</i>		
7653R ¹⁾	Nod ⁺ Fix ⁺ Sm ^R		USDA205 ³⁾	Nod ⁺ Fix ⁺	
7653R-1 ¹⁾	Nod ⁺ , 7653R缺失 3.18 $\times$ 10 ⁵ bp大质粒		<i>E. coli</i>		
HN10 ²⁾	7653R含有 <i>lacZ</i> 重组子		DH5 α	F ⁻ λ - Φ 80 <i>lacZ</i> M15 Δ (<i>lacZYA</i> <i>arg</i> F)	
HN18 ²⁾	7653R含有 <i>nod-lacZ</i> 重组子		plasmids		
HN46 ²⁾	7653R含有 <i>lacZ</i> 重组子		pIJ1216 ³⁾	<i>R. leg.</i> 6.8 $\times$ 10 ³ bp <i>nod</i> DABC克隆在 pKT230上	
HN49 ²⁾	7653R含有 <i>lacZ</i> 重组子		pSA30 ³⁾	<i>K. p. nif</i> HDK克隆在 pACYC184上	
HN114 ²⁾	7653R含有 <i>lacZ</i> 重组子		pM P220 ³⁾	Inc P,无启动子的 <i>lacZ</i> 转录表达载体, Tc ^R	
<i>R. legum inosarum</i>			pRK2013 ³⁾	Inc P, Km ^r <i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁻	
T83K3 ³⁾	Nod ⁺ Fix ⁺ Km ^R		pHN18 ²⁾	<i>R. huakuii</i> 7653R的 <i>nod-lacZ</i> 重组子克隆在转录表达载体 pMP220上	

文献及来源分别为: 1) 文献 [3]; 2) 本工作; 3) 本室保存

1.5 种子浸提物的制备

取 3 g紫云英种子洗干净,用含 70%的酒精表面消毒,然后用 10 mL无菌水浸泡 2 d,吸取棕黄色浸泡液,加无菌水至 10 mL,过滤灭菌,于 4 $^{\circ}$ C贮存.

1.6 β -半乳糖苷酶活性测定

将样品菌株活化,再转移至 S40根瘤菌液体培养基培养 24 h,在 600 nm测定 *A* 值,再将细菌稀释 *A* 至 0.1,每个样本各取 2份,5 mL,1份加入种子浸提物 100 μ L,另一份加等量无菌水为对照,28 $^{\circ}$ C振荡培养 10~ 24 h,然后按文献 [7]方法测定 β -半乳糖苷酶活性.

1.7 重组质粒的分离和酶切鉴定

从菌株 HN18提取质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,在含有 Tc (10 μ g/mL) 的 LB平板上筛选抗性菌落,挑取菌落进行小量制备质粒 DNA,再进行内切酶分析.

1.8 重组质粒三亲转移接合子的筛选

以 pRK2013为协助质粒,将重组质粒 pHN18分别导入受体菌株 7653R和 7653R-1,并在含 X-gal 种子浸提物 Sm和 Tc的 SM平板上筛选蓝色菌落.

2 结果与讨论

2.1 紫云英根瘤菌 7653R菌株的共生结瘤质粒遗传研究

2.1.1 7653R菌株共生结瘤质粒的测定 以前对紫云英根瘤菌 7653R菌株的质粒检测证

实有 2 条内源质粒带, 消除其中较大 1 条后产生不能共生结瘤的菌株 7653R-1^[3]. 本文利用 DNAGEL^[8]方法, 以快生大豆根瘤菌 USDA205 菌株已知分子质量的内源质粒为标准, 测得 7653R 菌株较大 1 条质粒带为 3.18×10^5 bp, 另 1 条为 1.74×10^5 bp (图 1).

2.1.2 侵染根毛测试 结果见表 2. 统计数据显 示, 在空白对照中, 紫云英植株根毛变形率 低于 1%, 它是由物理因素所引起; 野生型 菌株 7653R 所引起根毛变形的比率为 58.32%, 显示了野生型菌株的侵染作用能 引起极明显的根毛变形, 变形根毛中有典型 的“牧羊拐”状根毛; 7653R-1 菌株所引起 的根毛变形率为 3%, 未发现“牧羊拐”状 变形. 观测结果表明 7653R-1 菌株没有侵 染作用, 丧失了共生结瘤能力. 由此可判 断, 3.18×10^5 bp 大质粒决定 7653R 菌株 的早期结瘤作用, 此大质粒的缺失 (7653R-1) 使根瘤菌与植物根系的相互作用中止于 Hac 期或该期之前.

2.1.3 *nodDABC* 基因的物理鉴定 根毛实验显示早期结瘤基因定位于 3.18×10^5 bp 大质粒上, 为了进一步获得直接证据, 本文以豌豆根瘤菌 *nodDABC* 基因为探针, 与紫云英根瘤菌 7653R 菌株大质粒进行分子杂交, 杂交结果表明, 正对照豌豆根瘤菌菌株 T83K3 呈现较强阳性杂交, 另一正对照快生大豆根瘤菌菌株 USDA205 有相对弱的阳性杂交. 7653R 的 3.18×10^5 bp 大质粒呈阳性杂交, 7653R-1 没有阳性杂交, 因此可判定 *nodDABC* 定位于 3.18×10^5 bp 大质粒上. 根毛实验和探针杂交的结果是相一致的.

在初步了解内源质粒的遗传特性之后, 通过共生结瘤的功能试验, 发现大质粒与早期结瘤作用有关, 亦即意味着由根系分泌物诱导表达的早期结瘤基因定位于大质粒上, 分子杂交进一步证实早期结瘤基因的存在, 并证实早期结瘤基因定位于 3.18×10^5 bp 大质粒上, 从而为克隆结瘤基因提供了依据.

2.2 *lacZ* 重组子酶活性诱导表达

2.2.1 根瘤菌三亲转移接合子蓝色菌落的筛选 以 *lacZ* 重组子库为供体, 7653R 菌株为受体, 进行三亲本杂交, 抗性平板筛选蓝色菌落, 通过平板计数, 重组质粒向受体根瘤菌转移的频率约为 10^{-5} , 其中诱导表达蓝色的菌落占三亲转移接合子的 1% 左右. 分别挑取蓝色和白色的菌落到同样的平板再培养, 经传代培养证实颜色是稳定的.

2.2.2 蓝色菌落菌株的 β -半乳糖苷酶活性测定 将分别命名为 HN10, HN18, HN46, HN49 和 HN114 的 5 个菌株, 测定其 β -半乳糖苷酶活性, 结果表明 (表 3): 在有或无诱导物时, HN49 和 HN114 的酶活没有显著差别, 表现无诱导效应. 有诱导物的 HN18 菌株比无诱导物的酶活高 2.5 倍, 表现出诱导效应; 无诱导物的 HN10 和 HN46 比有诱导物的酶

图 1 根瘤菌大质粒电泳快速检测
Fig. 1 A rapid test of rhizobia megaplasmsids
1 *Rhizobium huakuii* 7653R 菌株
2 *Rhizobium huakuii* 7653R-1 菌株
3 *Rhizobium fredii* USDA205 菌株

表 2 根毛感染测试

Tab. 2 Test of root hair infection

项 目	对照	7653R	7653R-1
供试植株数 株	30	30	30
观察根毛总数 条	1 290	1 562	1 860
变形根毛总数 条	12	911	57
“牧羊拐”状根毛数 条	0	24	0
变形根毛百分率 %	0.93	58.32	3.06

活高 12.7 倍或 2.4 倍,说明诱导物对酶活有明显的抑制作用.各样本的酶活均显著高于对照菌株 7653R 的酶活.

实验结果显示,HN18 菌株的重组质粒上含有由黄酮类诱导物诱导表达的调控片段,它的诱导效应与早期结瘤基因 *nodABC* 基因受根系分泌物诱导所产生的效应相似,因此推测重组质粒可能含有 *nodABC* 基因的启动子及调控序列.其它几个菌株中所克隆到的启动子则与 *nod* 基因无关.

表 3 蓝色菌落 β -半乳糖苷酶活性的诱导效应¹⁾
Tab. 3 Induction of β -galactosidase activity in blue colonies $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$

菌 株	β 半乳糖苷酶活性 /U		菌 株	β 半乳糖苷酶活性 /U	
	加种子浸提物	无种子浸提物		加种子浸提物	无种子浸提物
7653R	50 $\pm$ 5	67 $\pm$ 17	HN46	517 $\pm$ 55	1 267 $\pm$ 55
HN10	117 $\pm$ 25	1 584 $\pm$ 457	HN49	1 100 $\pm$ 117	967 $\pm$ 77
HN18	1 750 $\pm$ 307	700 $\pm$ 28	HN114	1 184 $\pm$ 112	1 084 $\pm$ 190

1) 实验设 3 次重复
2.2.3 重组质粒的酶切和 *nod* 探针杂交 图 2a 的电泳结果显示,从 HN18 菌株分离到的重组质粒 pHN18 含有外源片段.以豌豆根瘤菌 *nodDABC* 基因片段为探针进行分子杂交,结果如图 2b 所示.杂交结果表明,pHN18 有 1 条约 $1.7 \times 10^3 \text{ bp}$ 的阳性杂交带,说明菌株 HN18 的质粒 pHN18 含有 *nod* 基因片段.

在 *lacZ* 重组子文库的构建中,所用表达载体 pM P220 只有 *lacZ* 基因及编码核糖体结合位点的序列而缺乏启动子和操作基因,因此没有表达 *lacZ* 的能力.只有与 7653R 菌株大质粒上具有启动子活性的片段融合到载体 pM P220 的 *lacZ* 基因上游,才能表达 β 半乳糖苷酶活性,*lacZ* 基因的表达水平由克隆到的调控序列的转录能力所决定.当克隆到早期结瘤基因时,黄酮类诱导物可激发 *nod* 基因的表达,从而带动 *lacZ* 的表达.

从所筛选到的菌株可看到,种子浸提物对 HN18 菌株有诱导效应,表现出黄酮类物质对早期结瘤基因表达的激发作用,同时也发现种子浸提物还有不同的诱导效应.由此可见,种子浸提物对早期结瘤有诱导作用,但其所含的成分并不局限于诱导早期结瘤作用,可能还有其它的诱导效应.进一步的探针杂交结果表明,从所筛选到的 HN18 菌株分离得到的重组质粒 pHN18 含有早期结瘤基因,诱导作用的结果和分子杂交的结论是相一致的.

2.3 重组质粒 pHN18 的 *lacZ* 诱导活性验证

将重组质粒 pHN18 导入受体菌株 7653R,在含诱导物的培养基上筛选到的三亲转移接合子均为蓝色,导入菌株 7653R-1 时,所获得的三亲转移接合子也全为蓝色.分别挑取菌落到同样的培养基(缺 Tc),菌落显示蓝色,而出发菌株 7653R 和 7653R-1 则是白色.

重组质粒 pHN18 再导入受体根瘤菌,所筛选到的三亲转移接合子均为蓝色,而对照菌



图 2 重组质粒 pHN18 的酶切分析和 *nod* 探针的分子杂交
Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pHN18 and its DIG-hybridization with *nodDABC* probe in *R. leg.*
(a) 重组质粒 pHN18 的酶切分析;
(b) *nodDABC* 探针杂交
1 pHN18-*EcoRI*
2 1 000 bp 梯度分子量标记

株为白色, 这一结果再次说明, pHN18具有早期结瘤基因所表现的诱导表达活性, 在功能上对前面的结果进行了验证. 值得注意的是, pHN18导入受体 7653R-1 (缺 *nodDABC*) 所得到的菌落也均为蓝色, 其结果说明一个问题, pHN18的诱导表达并不依赖于 3.18×10^5 bp大质粒. 进一步的研究正在进行之中.

参 考 文 献

- 1 魏辉, 李阜棣. 紫云英根瘤菌质粒携带共生基因的物理证据. 华中农业大学学报, 1989, 8: 12
- 2 金润之, 朱劲松, 沈善炯, 等. 紫云英根瘤菌 Ra159的巨大质粒上存在有 *nod*和 *nif*基因的证明. 微生物学报, 1993, 33: 170~176
- 3 周俊初, 张忠明, 陈华葵, 等. 紫云英根瘤菌质粒的研究 (II). 紫云英根瘤菌经高温和吡啶橙处理后结瘤和固氮突变株的产生和质粒消除. 华中农业大学学报, 1987, 6: 156~164
- 4 张忠明, 陈华葵, 范云六, 等. 紫云英根瘤菌基因文库的构建及含完整结瘤基因的重组质粒 pRaZ15的分离. 生物工程学报, 1991, 7: 213~219
- 5 周宗汉, 江群益, 沈善炯, 等. 紫云英根瘤菌基因文库的构建和结瘤基因片段的分离. 科学通报, 1989, 4: 305~308
- 6 Hirsch P K, Von Montagu M, Johnston A W B, et al. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strain *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol, 1980, 120: 403~412
- 7 Miller J T. Experiments in molecular genetics β -galactosidase assay. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 352~355
- 8 Kieser T. DNAGEL: a computer program for determining DNA fragment sizes using a small computer equipped with a graphic tablet. Nucleic Acid Res, 1984, 12: 679~688

Cloning and Analysis of the Regulatory DNA Fragment of Symbiotic Genes in *Rhizobium huakuii* Strain 7653R

Nong Guang* Zhang Zhongming Hu Furong Chen Huakui

Abstract The experiment of rhizobia inoculation with the *Rhizobium huakuii* strain 7653R and its mutant Nod⁻ strain 7653R-1 showed that the 3.18×10^5 bp large plasmid in strain 7653R was responsible for early nodulation. The Nod⁻ strain 7653R-1 was cured of the 3.18×10^5 bp plasmid and unable to cause root hair curling, which means that the rhizobia-legume interaction stops before or at the Hac stage. Hybridization of probe *nodDABC* showed that the tested genes locate on the 3.18×10^5 bp plasmid of the strain 7653R. Hence, the 3.18×10^5 bp plasmid was identified as the symbiotic plasmid in strain 7653R. The large plasmids of strain 7653R was digested with restriction enzyme *EcoRI* and cloned into the expression vector pM P220. A gene library was constructed, containing different recombinant plasmids harbouring *LacZ* gene, which were transferred into the recipient strain 7653R. Tri-transconjugants were selected onto plates containing X-gal and seed extract. Five blue colonies were assayed of their β -galactosidase activity after incubation with or without seed extract. A positive inducible strain HN18 was obtained. Hybridization between *nodDABC* probe and recombinant plasmid pHN18 showed a 1.7×10^3 bp positive band, which means that the early nodulation genes have been partially cloned. The evidence suggests that the pHN18 contains a promoter of *nod* operon.

Keywords *Rhizobium huakuii*, *nod* genes, DIG hybridization, *lacZ* gene

* The State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275