

## 提高大豆根瘤菌质粒稳定性的研究\*

刘墨青\*\* 李友国 周俊初\*\*\*

(华中农业大学 农业部农业微生物重点开放性实验室武汉 430070)

**摘 要** :以发光酶基因 *luxAB* 作为报告基因,将广谱稳定性质粒 pTR102 的 *parCBA/DE* 基因导入含 3.7kb 增效片段的 pLARF3 并去除该质粒的 *cos* 序列,构建成重组质粒 pHN115 和 pHN156。同时,构建只带有 *cos* 序列和 *luxAB* 的参比质粒 pHN157 和 pHN158。将上述 4 种质粒通过三亲本杂交分别导入费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) HN01,将 pHN155 和 pHN158 通过两亲本杂交分别导入大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) TA11,在人工继代培养条件下比较测定其质粒保持率。结果表明,经连续转接培养 7 次后, pHN155、pHN156、pHN157 和 pHN158 在 HN01 中的质粒保持率分别为 100%、67%、72% 和 92%。连续转接培养 4 次后, pHN155 和 pHN158 在 TA11 中的质粒保持率分别为 98% 和 92%。说明 *parCBA/DE* 基因能显著提高质粒在快、慢生型大豆根瘤菌中的遗传稳定性,*cos* 序列的去除也有一定的作用。

**关键词** 根瘤菌, *parCBA/DE*, *luxAB*, 质粒稳定性

中图分类号 Q939.09 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)03-0296-00

周俊初等<sup>[1,2]</sup>从费氏中华根瘤菌 B52 中分离筛选到一个 3.7kb 的增效片段,含有该片段的大豆慢生根瘤菌 HN32,在黑龙江、广西和四川等地区的小区田间试验和大面积推广应用中有明显的增产效果<sup>[3]</sup>。由于含增效片段的质粒 pLARF1 拷贝数低,在传代中容易丢失,而且根据质粒携带的四环素抗性标记难于准确检测田间占瘤率。Eberl 等<sup>[4]</sup>的研究表明, *parCBA* 操纵子编码一个质粒多聚体解离系统并含有解离多聚体所必须的顺式作用位点。 *parDE* 操纵子编码的蛋白可以通过杀伤部分子代细胞来提高质粒的稳定性。1995 年, Sia 等<sup>[5]</sup>的研究证明 *par* 基因在 *E. coli*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Azotobacter vinelandii*、*Acinetobacter calcoaeticus*、*Caulobacter crescentus* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 中均有稳定质粒的功能,但 *par* 基因能否在大豆根瘤菌中提高质粒稳定性则尚未报道。因此,本研究以发光酶基因 *luxAB* 作为报告基因,通过在质粒载体上克隆来自广谱质粒 RK2 的可以增强质粒稳定性的 *parCAB/DE* 基因,使 3.7kb 的增效片段在重组菌中不易丢失,以构建出稳定增效并易于追踪检测的重组大豆根瘤菌。

\* 国家 863 高技术研究发展计划资助(863-101-03-03-07)

\*\*现在中国科学院微生物研究所工作

\*\*\*联系作者

作者简介 刘墨青(1973-),女,河南新乡人,中国科学院微生物研究所,硕士,主要从事微生物代谢研究

收稿日期:1999-02-01,修回日期:1999-06-09

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

见表 1。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids tested

Strain or plasmid	Relevant gene or characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>	<i>supE44 ΔlacU169 φ80lacZΔM15</i>	This lab.
DH5α	<i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	
S17-1 λ- <i>pir</i>	λ- <i>pir</i> lysogen of S17-1	
<i>S. fredii</i>		This lab.
HN01	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	This lab.
<i>B. japonicum</i>		
TA11	Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup>	
plasmid		
pRK2013	<i>tra<sup>+</sup> ,mob<sup>-</sup> ,Spe<sup>R</sup></i>	This lab.
pTR102	<i>mob<sup>+</sup> ,tra<sup>-</sup> ,Amp<sup>R</sup> ,Tc<sup>R</sup></i>	This lab.
pIJ2925	pUC19 的衍生质粒 ,Ap <sup>R</sup>	This lab.
pHN151	<i>parCBA/DE</i> 克隆于 pIJ2925 ,Amp <sup>R</sup>	This work.
pHN152	<i>luxAB</i> 表达单元克隆于 pHN151 ,Amp <sup>R</sup>	This work.
pHN101	<i>luxAB</i> 表达单元克隆于 pIJ2925 ,Ap <sup>R</sup>	This lab.
pHN104	增效片段克隆于 pUC118	This lab.
pLAFR3	<i>mob<sup>+</sup> ,tra<sup>-</sup> ,Tc<sup>R</sup> cosmid</i>	This lab.
pHN154	增效片段克隆于 pLAFR3	This work.
pHN155	<i>parCBA/DE</i> 和 <i>luxAB</i> 表达单元克隆于 pHN154	This work.
pHN156	<i>luxAB</i> 表达单元克隆于 pHN154	This work.
pHN157	<i>luxAB</i> 表达单元克隆于 pLAFR3	This work.
pHN158	<i>luxAB</i> 表达单元和 <i>parCBA/DE</i> 克隆于 pLAFR3 ,cosmid	This work.

1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌用 LB 培养基于 37℃ 下培养。费氏中华根瘤菌用 TY 培养基<sup>[2]</sup> ,大豆慢生根瘤菌用 SG 培养基<sup>[7]</sup> ,在 28℃ 下培养。费氏中华根瘤菌的三亲本杂交采用 SM 选择性培养基<sup>[2]</sup> ,大豆慢生根瘤菌的两亲本杂交采用 BD 培养基<sup>[6]</sup>。

1.3 抗生素与浓度

氨苄青霉素( Amp )100μg/mL ;壮观霉素( Spe )50μg/mL ;四环素( Tc )20~70μg/mL。

1.4 酶和特殊试剂

限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶和碱性磷酸酶购自华美生物工程公司和 Promega 公司。X-gal 和 IPTG 购自 Sigma 公司。

1.5 DNA 操作

质粒 DNA 提取、酶切、片段回收、线性 DNA 的去磷酸化、酶连与细菌转化等均按文

献 7 进行。

1.6 三亲本杂交和两亲本杂交接合子的筛选

三亲本杂交方法见文献 [2], 两亲本杂交方法见文献 [6], 同时利用选择性培养基筛选发光转移接合子。

1.7 细菌发光酶活性的检测

见文献 [8]。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒 pHN155 和 pHN156 的构建

pTR102 经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切后, 回收 3.2kb 的 *parCBA/DE*, 与相同双酶切的克隆载体 pIJ2925 连接得到中间载体 pHN151。pHN101 经 *Bgl* II 酶切后回收 3.3kb 的 *luxAB* 片段, 与经 *Bam* H I 酶切并去磷酸化后的中间质粒 pHN151 连接, 得到 pHN152。pLAFR3 经 *Bgl* II 酶切回收大片段, 与经 *Bam* H I 酶切的 pHN104 连接, 筛选得到含有增效片段的 pHN154。最后, 用 *Bgl* II 酶切 pHN152, 回收含 *luxAB* 和 *parCBA/DE* 的大片段, 连接在 pHN154 的 *Bam* H I 位点, 得到重组质粒 pHN155。将单独的 *luxAB* 片段连接在 pHN154 的 *Bam* H I 位点, 得到重组质粒 pHN156。重组质粒的酶切验证见图 1。

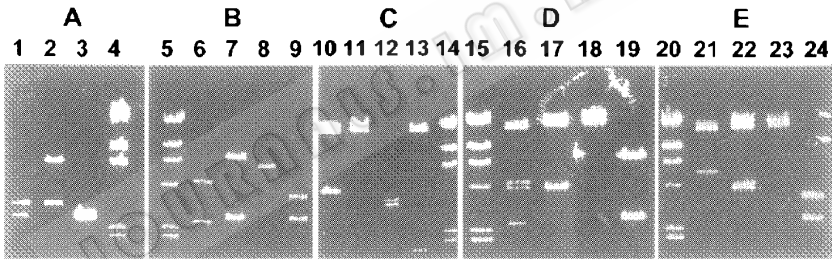


图 1 重组质粒 pHN151、pHN152、pHN154、pHN155 和 pHN156 的酶切分析

- Fig. 1 Analysis of recombinant plasmid pHN151 pHN152 pHN154 pHN155 and pHN156 by enzyme digestion
- A

1. pHN151/*Kpn* I + *Bam* H I ;  
2. pTR102/*Kpn* I + *Bam* H I ;  
3. pIJ2925/*Kpn* I + *Bam* H I ;  
4.  $\lambda$ DNA/*Hind* III + Marker.

B

5.  $\lambda$ DNA/*Hind* III ;  
6. *luxAB-parCBA/DE/Eco*RI ;  
7. pHN152/*Bgl* II ;  
8. pHN151/*Bam* H I ;  
9. pHN101/*Bgl* II ;

C

10. pHN154/*Eco*RI ;  
11. pLAR3/*Eco*RI ;  
12. pHN104/*Bam* H I ;  
13. pLAFR3/*Bgl* II ;  
14.  $\lambda$ DNA/*Hind* III .

D

15.  $\lambda$ DNA/*Hind* III ;  
16. pHN155/*Eco*RI ;  
17. pHN154/*Eco*RI ;  
18. pHN154/*Bam* H I ;  
19. pHN152/*Bgl* II ;

E

20.  $\lambda$ DNA/*Hind* III ;  
21. pHN156/*Eco*RI ;  
22. pHN154/*Eco*RI ;  
23. pHN154/*Bam* H I ;  
24. pHN101/*Bgl* II .

2.2 参比质粒 pHN157 和 pHN158 的构建

用 *Bgl* II 分别酶切 pHN101 和 pHN152, 并回收 *luxAB* 和 *parCBA/DE* + *luxAB* 片段。将这两个片段分别连接在 pLAFR3 的 *Bam* H I 位点, 通过发光酶活性筛选得到转化子, 分别命名为 pHN157 和 pHN158。质粒的酶切验证见图 2。

2.3 重组质粒导入大豆根瘤菌

将 pHN155、pHN156、pHN157 和 pHN158 等 4 个重组质粒,在辅助质粒 pRK2013 的协助下,通过三亲本杂交分别导入 HN01。在含有 20μg/mL 四环素 SM 的培养基上筛选得到发光的转移接合子。将 pHN155 和 pHN158 分别通过两亲本杂交导入 TA11,在含有 70μg/mL 四环素的 BD 培养基上筛选得到发光的转移接合子。

2.4 重组质粒的稳定性测定

为了探讨 pLAFR3 上 *cos* 序列的存在以及 3.2kb 的 *parCBA/DE* 对质粒遗传稳定性的影响,本研究选取 HN01( pHN155 ) HN01 ( pHN156 ) HN01 ( pHN157 ) 和 HN01 ( pHN158 )等 4 株费氏中华根瘤菌在 TY 液体培养基连续转接培养的方法进行质粒稳定性的比较测定。在连续 7 次转接中,于每次转接前将菌悬液均稀释涂皿,通过发光菌落的比例计算质粒的保持率。

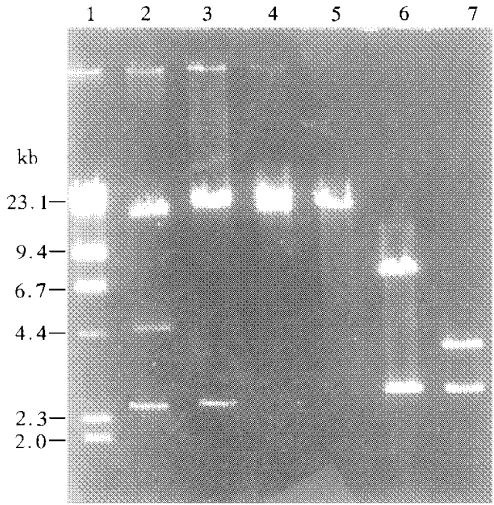


图 2 重组质粒 pHN157 和 pHN158 的酶切分析

Fig.2 Analysis of recombinant plasmid pHN157 and pHN158 by enzyme digestion  
1. λDNA/*Hind* III ; 2. pHN158/*Eco*R I ;3. pHN157/*Eco*R I ;4. pLAFR3/*Eco*R I ;5. pLAFR3/*Bam*H I ;6. pHN152/*Bgl* II ;7. pHN101*Bgl* II .

表 2 供试质粒经连续转接后的保持率

Strains tested	Number of inoculation						
	1	2	3	4	5	6	7
HN01( pHN155 )	100	100	100	100	100	100	100
HN01( pHN156 )	97	93	84	80	75	67	67
HN01( pHN157 )	91	82	79	78	74	72	60
HN01( pHN158 )	100	100	98	95	93	92	90

由表 2 可见,重组质粒 pHN155 和 pHN158 在 HN01 中的稳定性明显高于 pHN156 和 pHN157。菌株 HN01( pHN155 )在连续转接 7 次后几乎没有质粒丢失发生。由于这两种质粒均克隆有 3.2kb 的 *parCBA/DE*,本结果表明,它们在 HN01 中能显著提高质粒的稳定性。比较质粒 pHN155 与 pHN158 及 pHN156 与 pHN157 的稳定性差异,表明 *cos* 序列对质粒遗传稳定性也有一定的影响。

在 SG 液体培养条件下,将 TA11( pHN155 )和 TA11( pHN158 )连续转接 4 次,测定结果见表 3。

表 3 供试质粒连续转接后的质粒保持率

Strains tested	Number of inoculation			
	1	2	3	4
TA11( pHN155 )	100	100	100	98
TA11( pHN158 )	100	98	93	92

由表 3 可见 ,*parCBA/DE* 也能提高质粒在大豆慢生根瘤菌中的遗传稳定性 ,而且 *cos* 序列的去除也起了一定的作用。由于质粒 *pHN156* 和 *pHN157* 通过两亲本杂交一直未能得到发光的转移接合子 ,因此本研究缺少未克隆 *parCBA/DE* 的对照菌株 ,这也从侧面表明这两个不含 *parCBA/DE* 的质粒极易丢失 ,从而大大影响了接合转移的效率。

本研究结果表明 ,供试载体仅去掉 *pLAFR3* 的 *cos* 序列可使质粒保持率有一定的提高 ,但效果有限。克隆 *par* 基因可以使质粒的稳定性显著提高 ,若在去除了 *cos* 序列的同时克隆 *par* 基因 ,则可以使重组质粒在快、慢生型大豆根瘤菌中稳定传代。因此 ,本研究为下一步克隆异源基因和提高共生固氮效应打下了基础。

参 考 文 献

[ 1 ] 张忠明 ,莫才清 ,沈 辉 ,等 . 华中农业大学学报 ,1992 ,11( 1 ) 94~96。  
[ 2 ] 周俊初 ,沈 辉 ,张忠明 ,等 . 武汉大学学报( 自然科学报 ) ,1990( 增刊 ) :11~17。  
[ 3 ] 莫才清 ,张忠明 ,沈 辉 ,等 . 华中农业大学学报 ,1992 ,11( 4 ) 364~368。  
[ 4 ] Ebeeri L , Givskov M , Schwab H . *Mol Microbiol* ,1992 ,6 :1969~1979。  
[ 5 ] Sia E A , Roberts R C , Easter C , *et al.* *J Bacteriol* ,1995 ,177 :2779~2789。  
[ 6 ] Wilson K J , Sessitsch A , Carbo J C , *et al.* *Microbiol* ,1995 ,141 :1691~1705。  
[ 7 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989。  
[ 8 ] 莫才清 ,覃雅丽 ,周俊初 ,等 . 1998 ,微生物学报 ,38( 3 ) 213~218。

STUDY ON THE IMPROVEMENT OF PLASMID STABILITY  
IN SOYBEAN RHIZOBIA

Liu Moqing Li Youguo Zhou Junchou

( The Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 )

**Abstract :** By using *luxAB* as the report genes ,3.2kb *parCBA/DE* gene fragment from *pTR102* was inserted into *pLAFR3* which contained a 3.7kb enhancing fragment and deleted its *cos* site. Recombant plasmids *pHN155* and *pHN156* were obtained. Contrasted plasmids *pHN157* and *pHN158* which contained *cos* site were also constructed. These four plasmids were transferred into *Sinorhizobium fredii* HN01 by tri-parental mating , and plasmid *pHN155* and *pHN158* were introduced into *Bradyrhizobium japonicum* TA11 by two-parental mating. The stability of the above plasmids was compared under free-living conditions and the results showed that the *parCBA/DE* could obviously enhance plasmid stability both in *S. fredii* and *B. japonicum* , and deletion of *cos* site showed only less effect.

**Key words :** Soybean rhizobium , *parCBA/DE* , *luxAB* , Plasmid stability