

苜蓿中华根瘤菌与耐盐有关 DNA 片段的 亚克隆和测序分析*

葛世超 樊振川 陈雪松 杨苏声**

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)

摘 要 将苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)042B 与耐盐有关的 4kb *Cla* I DNA 片段克隆在 pML122 上,用 *Hind* III 酶切下其 2.4kb DNA 片段,回收后与 pBBR1-MCS2 连接,然后转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α ,筛选到转化子 GS2。将残留在 pML122 上 1.6kb *Cla* I -*Hind* III DNA 片段连同质粒一起回收,让其自连,转化大肠杆菌 S17-1,得到转化子 GS0。以 GS0 为供体,042B 的盐敏感突变株 GZ17 为受体,进行二亲本杂交,没有得到接合子。以 GS2 为供体, GZ17 为受体,在辅助质粒 pRK2013 的协助下,进行三亲本杂交,筛选到接合子 GG2,获得 2.4kb *Hind* III 与耐盐有关的 DNA 片段。将此片段连接到测序载体 pGEM-7Zf(+)上进行测序。测序结果表明,该 2.4kb *Hind* III DNA 片段含有 3 个开放阅读框(ORF)。在此基础上再一次亚克隆,获得 1.9kb 与耐盐有关的 DNA 片段。

关键词: 苜蓿中华根瘤菌,耐盐,亚克隆,测序

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2001)01-0009-07

目前,以大肠杆菌为材料所进行的渗透调节机制的研究日益深入,已相继分离和鉴定了与渗透保护物合成有关的结构基因和渗透调节基因^[1,2]。然而,对于遗传背景不太清楚的根瘤菌,过去的研究工作主要集中在根瘤菌对渗透胁迫的生理学反应上^[3],只是在最近几年,根瘤菌的耐盐机制研究才取得一些进展。Dylan 等发现了苜蓿中华根瘤菌壁膜间隙葡聚糖的合成基因 *ndvA* 和 *ndvB*,它们分别编码与环 β -1,2-葡聚糖的合成和运输有关的蛋白^[4,5],而该葡聚糖对根瘤菌在低渗条件下的适应和生长起重要作用^[6],研究表明,这种作用只有在环 β -1,2-葡聚糖被修饰后才能产生,而 *cgmB* 基因编码的蛋白参与了环 β -1,2-葡聚糖的修饰^[7,8]。甘氨酸甜菜碱是重要的渗透调节保护物,当遇到高渗环境时,有些根瘤菌能积累甘氨酸甜菜碱来对抗高渗冲击^[9]。Mange 等(1998)指出,苜蓿中华根瘤菌的甘氨酸甜菜碱的合成由 *betICBA* 组成的操纵子调控。其中, *betA* 编码胆碱脱氢酶, *betB* 编码甜菜醛脱氢酶,分别催化胆碱生成甜菜醛,并由甜菜醛生成甘氨酸甜菜碱。 *betI* 编码调节蛋白。这 3 种蛋白在大肠杆菌细胞内也存在。此外, *betC* 编码硫酸胆碱酶,催化硫酸胆碱、磷酸胆碱生成胆碱,其氨基酸序列与大肠杆菌细胞内类似的蛋白质只有 24% 的同源性^[10]。

* 高等学校博士学科点专项科研基金和欧盟科研基金项目(ERBIC18CT960103)资助

** 联系人

作者简介:葛世超(1963-),男,安徽省人,讲师,现在中国农业大学在读博士,主要从事微生物分子遗传学方面的研究。

收稿日期:2000-05-13,修回日期:2000-07-24

苜蓿中华根瘤菌 042B 具有良好的耐盐性状 ,能在 0.5mol/L NaCl 条件下生长。本室构建了该菌的基因文库 ,从中分离到 4kb 与耐盐有关的 DNA 片段^[11]。本文拟将该片段进行亚克隆 ,以期获得更短的与渗透调节有关的 DNA 片段 ,并测定其序列 ,为分离根瘤菌的渗透基因和有关蛋白的表达奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

列于表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant Characteristics	Sources
Strains		
<i>S. meliloti</i> 042B	Growth in FY medium with 0.5mol/L NaCl	This laboratory
GZ17	Salt sensitive mutant from 042B	This laboratory
<i>E. coli</i> DH5α	Host for recombinant plasmid	This laboratory
S17-1	<i>pro</i> ⁻	Chinese Academy of Agricultural Sciences
G6	Transformant containing 4 kb DNA fragment related to salt tolerance	This laboratory
GS2	Transformant containing 2.4 kb DNA fragment related to salt tolerance	This study
GS2-1	Transformant containing 1.9 kb DNA fragment related to salt tolerance	This study
GG2	Transconjugant containing 2.4kb DNA fragment related to salt tolerance	This study
GG2-1	Transconjugant containing 1.9kb DNA fragment related to salt tolerance	This study
Plasmids		
pBBR1-MCS2	Cloning vector , Km ^r	Kovach(1995)
pML122	Gm ^r Km ^r	University of East Anglia
pRK2013	Helper plasmid , Km ^r	University of East Anglia
pGEM-7Z(+)	Sequencing plasmid , Amp ^r	Promega

1.2 培养基

TY 培养基^[12]用于根瘤菌的培养 ,LB 培养基^[13]用于大肠杆菌的培养 ,FY 培养基^[14]为根瘤菌的基本培养基 ,用于接合子的筛选 ,其中含有 0.4mol/L NaCl 和相应的抗生素。

1.3 DNA 的体外操作

质粒 DNA 的提取、酶切、转化和亚克隆等均按文献 13 进行。

1.4 二亲本和三亲本杂交

二亲本杂交和三亲本杂交按文献 15 进行。

1.5 DNA 测序和分析

DNA 测序工作由赛百盛公司完成。利用国际互联网的 ORF Finder 和 BLAST 软件进行开放阅读框分析和同源性比较。

2 结果和讨论

2.1 与耐盐有关的 DNA 片段的亚克隆和检测

将含有与耐盐有关 4kb 的 DNA 片段克隆在 pML122 上,将其转化子 G6 与 042B 的盐敏感突变株 GZ17 杂交,在含有 0.4mol/L NaCl 的平板上得到接合子 GS^[11],证实该 4kb DNA 片段与耐盐有关。

提取 G6 的重组质粒 pG6,用 *Hind*Ⅲ 酶切可得到大小比较适中的 DNA 片段(图 1-A 泳道 2)选作为亚克隆用酶。为便于用蓝、白斑菌落筛选,本文用亚克隆载体 pBBR1-MCS2 作为根瘤菌和大肠杆菌之间的穿梭质粒。

分别提取 pG6 和 pBBR1-MCS2,用 *Hind*Ⅲ 酶切。再用电洗脱回收酶切后的 DNA 片段,以 2:1(摩尔比)的比例与酶切后的 pBBR1-MCS2(图 1-A 泳道 3)连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。然后,涂布在含有 30 μ g/mL 卡那霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上,进行蓝、白斑菌落筛选。将得到的转化子接种于 LB 液体中培养,提取其质粒,用 *Hind*Ⅲ 酶切。电泳检测表明,该转化子含有 2.4kb *Hind*Ⅲ 的 DNA 片段,编号为 GS(图 1-A 泳道 4)。

检测盐敏感突变株 GZ17 的回复突变率为 $3.86\times 10^{-10}<10^{-8}$,符合实验要求。将转化子 GS2、辅助质粒 pRK2013 和 GZ17 以等比例混和,进行三亲本杂交,在含有 30 μ g/mL 卡那霉素、30 μ g/mL 萘啶酮酸和 0.4mol/L NaCl 的 FY 平板上培养,7d 后获得接合子,编号为 GG2。电泳检测发现,GG2 的重组质粒 pGG2 含有 2.4kb *Hind*Ⅲ 与耐盐有关的 DNA 片段(图 1-B 泳道 2),而对照 GS2、GZ17 都没有菌落长出。

用 *Hind*Ⅲ 从 pG6 切去 2.4kb DNA 片段后,将残留在 pML122 上的 *Cla*I-*Hind*Ⅲ 1.6kb DNA 片段连同该质粒一起用电洗脱法回收后,让其自连,转化大肠杆菌 S17-1,获得转化子,编号为 GS0,再将 GS0 和 GZ17 进行二亲本杂交,在含有同样成分的 FY 平板上筛选。然而,培养 10d 后都没有菌落长出,说明该 DNA 片段与耐盐无关。

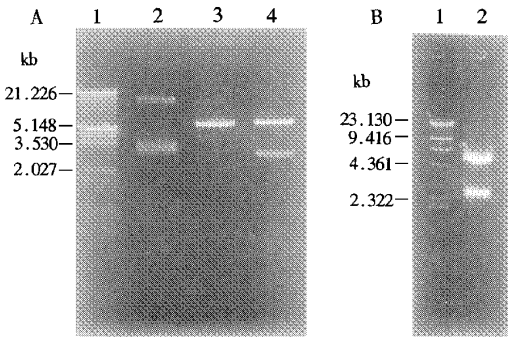


图 1 重组质粒的限制性内切酶分析

Fig.1 The analysis of restriction enzyme digestion for recombinant plasmid

A 1. λ DNA/*Eco*R I -*Hind*Ⅲ ; 2. pG6/*Hind*Ⅲ ; 3. pBBR1-MCS2/*Hind*Ⅲ ; 4. pGS2/*Hind*Ⅲ
B 1. λ DNA/*Hind*Ⅲ ; 2. pGG2/*Hind*Ⅲ .

2.2 与耐盐有关的 2.4kb DNA 片段的测序分析和进一步亚克隆

分别提取 pGS2 和测序载体 pGEM-7Z(+)用 *Hind*Ⅲ 酶切,连接后转化大肠杆菌

DH5 α 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上进行蓝、白斑菌落筛选。挑取白色菌落,提取其质粒。酶切检测表明 2.4kb *Hind*Ⅲ DNA 片段已经连到测序载体上(图 2 泳道 4)。

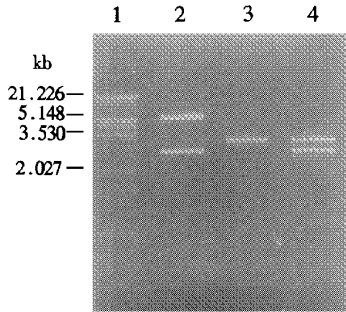


图 2 测序重组质粒 pGEM-7Z(+)-2.4 的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of sequencing recombinant plasmid

- 1. λ DNA/*Eco*R I -*Hind*Ⅲ ; 2. pGS2/*Hind*Ⅲ ;
- 3. pGEM-7z(+)*/Hind*Ⅲ ; 4. pGEM-7Z(+)-2.4/*Hind*Ⅲ .

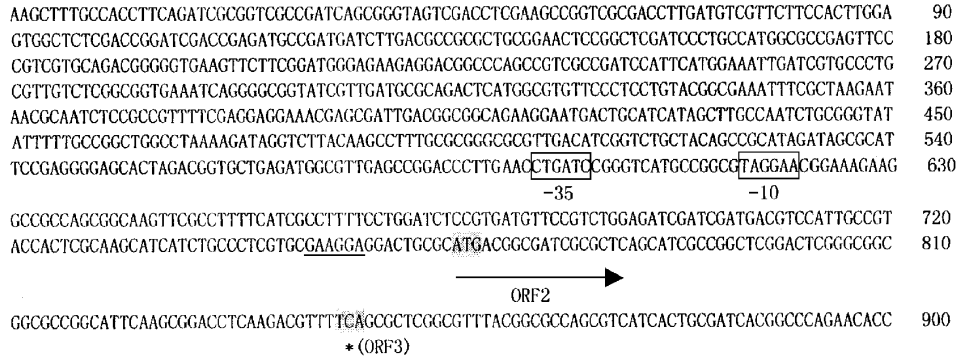
大量提取该重组质粒,送交赛百盛公司测序,得到该 DNA 片段的序列,全长为 2464bp(图 3)。将以上的 DNA 序列输入 DNAMAN 软件进行酶切位点和阅读框架分析,制作其物理图谱,并初步确定 3 个 ORFs (图 4)。

再通过网络服务系统与非重复基因库进行同源性比较,发现 ORF1 为一个不完整的编码苜蓿中华根瘤菌胞外多糖合成酶的核苷酸序列^[16]。ORF2 在正链上编码 266 个氨基酸,推测的氨基酸序列与苜

蓿中华根瘤菌的焦磷酸硫酸素合成酶有 99.5% 的同源性^[16](图 5),而焦磷酸硫酸素作为细胞内许多酶的辅酶,在代谢中具有不可替代的作用。另外,对 ORF2 启动区序列的分析发现,该启动区存在 1 个类似于大肠杆菌 *proP* 基因启动子 -35 和 -10 区的元件(图 3),*proP* 的表达受到渗透压的调控^[17]。因此,推测 ORF2 可能参与耐盐调控。

由 ORF3 推测的氨基酸序列与苜蓿中华根瘤菌环 β -1,2-葡聚糖修饰蛋白有 31% 的同源性(图 6),而该蛋白由 *cgmB* 基因编码合成,对环 β -1,2-葡聚糖具有修饰作用,修饰后的环 β -1,2-葡聚糖与苜蓿中华根瘤菌的耐盐调控有密切关系^[7,8]。

根据 2.4kb DNA 片段的物理图谱,在 1 917bp 处有一个 *Sac* II 酶切位点,用 *Sac* II 将该片段切成两段。1 段约 0.5kb(图 7-A 泳道 2),包含不完整的 ORF1,回收后与 pBBR1-MCS2 连接,再转化大肠杆菌 DH5 α ,通过蓝、白斑菌落筛选得到转化子,编号为 GS2-2。提取 GS2-2 的重组质粒,用 *Sac* II 酶切,可得到 0.5kb 的 DNA 片段(图 7-A 泳道 3)。以 GS2-2 为供体, *pRK2013* 为辅助质粒, *GZ17* 为受体,进行三亲本杂交,但 10d 后都没有菌落长出,证明该片段与耐盐无关。



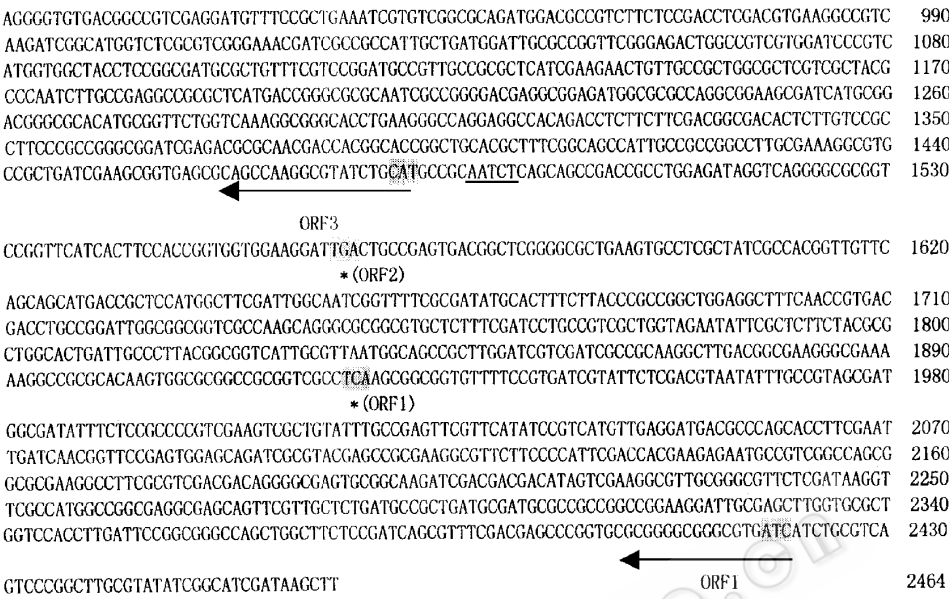


图 3 2.4kb DNA 片段的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the 2.4kb DNA fragment of ORFs

Arrows represent the direction of transcription of these ORFs
Putative ribosome-binding sites are underlined. -3.5 and -10 represent respectively -35 sequence and -10 sequence of ORF2, respectively. The stop codons are marked with asterisks.

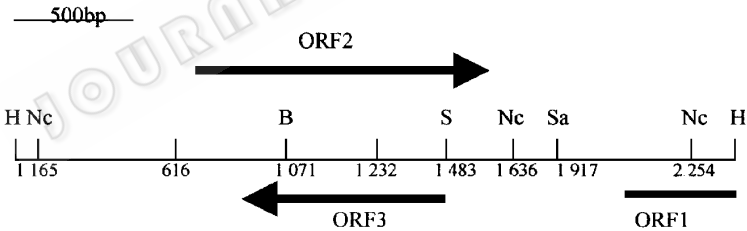


图 4 2.4kb DNA 片段的物理图谱和可能的开放阅读框

Fig. 4 Physical map and the possible open reading frames of 2.4kb DNA fragment

B :Bam HI ; H :Hind III ; S :Sph I ; Nc :Nco I ; Sa :Sac II .



图 5 ORF2 编码蛋白的氨基酸序列同源性比较

Fig. 5 Alignment of the amino acid sequence of the ORF2 putative protein homologues

THIP :Thi protein of *S. meliloti*. Identical amino acid residues are shown against a dark background.

ORF3 82 ARHLRLVPGDCAPGHERGLGKIG.....RSDERQRQQFFDERGNGIRTQRI
BGMP 548 AKHGEEEHGDRGPGRAHGIGETCDGVGPGPAHDHFDGEDERYRNEKREERTAGARQGSRV

ORF3 129 AGG.....SHHDGLHDGQSPEPAQSI
BGMP 609 SCGRAFPVGVDLRAAHGGTDTGQRASPVSQI

图 6 ORF3 编码蛋白的氨基酸序列同源性比较

Fig.6 Alignment of the amino acid sequences of the ORF3 putative protein
BGMP cyclic beta-1 2-glucan modification protein of *S. meliloti*.
Identical amino acid residues are shown against a dark background.

第 2 段约为 1.9kb 连在 pBBR1-MCS2 上(图 7-A 泳道 2),回收后让其自连,转化大肠杆菌 S17-1,得转化子,编号为 GS2-1。提取 GS2-1 的重组质粒,用 *Hind* III-*Sac* II 消化,得到 1.9kb 的 DNA 片段(图 7-A 泳道 4)。以 GS2-1 为供体, *GZ17* 为受体进行二亲本杂交,得到接合子 GG2-1,表明该 1.9kb *Hind* III-*Sac* II DNA 片段与耐盐有关(图 7-B 泳道 1)。

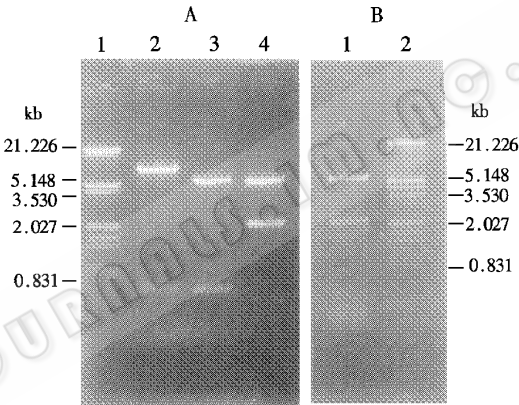


图 7 重组质粒的限制性内切酶分析

Fig. 7 The analysis of restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

A 1. λ DNA/*Eco*R I -*Hind* III ; 2. pGS2/*Sac* II ; 3. pGS2-2/*Sac* II ; 4. pGS2-1/*Hind* III -*Sac* II .
B 1. pGG2-1/*Hind* III -*Sac* II ; 2. λ DNA/*Eco*R I -*Hind* III .

上述结果表明,该 1.9kb *Hind* III-*Sac* III DNA 片段与耐盐有关,可能由 ORF2、ORF3 单独或由它们共同调控和修饰与耐盐有关的基因或基因产物,它们对根瘤菌耐盐的渗透调节有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Csonka L N. *Microbiol Rev* ,1989 **53** :121~147.
[2] Csonka L N ,Hanson A D. *Annu Rev Microbiol* ,1991 **45** :569~606.
[3] Hua S S ,Tsai Y ,Lichers G M. *Appl Environ Microbiol* ,1982 **44** :135~140.
[4] Dylan T ,Helinski D R ,Ditta G S. *J Bacterial* ,1990 **172** :1400~1408.
[5] Ielpi l ,Dylan T. *J Biol Chem* ,1990 **265** :2843~2851.
[6] Breedveld M W ,Miller K J. *Microbiol Rev* ,1994 **58** :145~161.

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

- [7] Ping W , Cheryl I S , Hadley J A , *et al.* . *J Bacteriol* ,1999 ,**181** :4576~4583.
- [8] Michael W B , Jill A H , Kraren J M. *J Bacteriol* ,1995 ,**177** :6346~6351.
- [9] Rudulier L D , Bernard T. *FEMS Microbiol Rew.* 1986 ,**39** :67~72.
- [10] Magne Ø stera°S , Rudulier L D. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1998 ,**95** :11394~11399.
- [11] 陈雪松 张海瑜 高为民 ,等 . 微生物学报 ,1999 ,**39**(6) :489~494.
- [12] Meade H N , Long S R , Gary B , *et al.* . *J Bacteriol* ,1982 ,**149** :114~122.
- [13] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory , 1989.
- [14] 杨苏声 吴拙如 高为民 ,等 . 生物工程学报 ,1993 ,**9**(3) :193~197.
- [15] Rhonda J H , Michael M , Bruno W S. *J Bacteriol* ,1993 ,**175**(21) :6945~6952.
- [16] Anke B , Annelie K , Walter A , *et al.* . *J Mol Genet* , 1993 ,**241** :367~379.
- [17] Jay M A , Merna V. *J Bacteriol* ,1995 ,**177** :144~151.

SUBCLONING AND SEQUENCING OF DNA FRAGMENT RELATED TO SALT TOLERANCE IN *SINORHIZOBIUM MELILOTI* 042B*

Ge Shichao Fan Zhenchuan Chen Xuesong Yang Susheng**

(Department of Microbiology , College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 ,China)

Abstract : A 4kb *Cla*I DNA fragment related to salt tolerance from *S. meliloti* 042B was digested by *Hind*Ⅲ down 2.4kb fragment , and a 1.6kb *Cla*I-*Hind*Ⅲ fragment was retained on plasmid pML122. Then , the 2.4kb DNA fragment was ligated with plasmid pBBR1-MCS2 , and the recombinant plasmid was transformed to *E. coli* DH5α , and transformant GS2 was obtained. Three-parental mating experiments were carried out with transformant GS2 as donor , salt sensitive strains GZ17 as recipient and pRK2013 as helper plasmid , then the transconjugant GG2 was selected on FY plates containing kanamycin and 0.4mol/L NaCl. The remaining DNA fragment was self ligated with pML122 and then transformed into *E. coli* S17-1 and transformant GS0 was obtained. Two-parental mating experiment was carried out with transformant GS0 as donor and salt sensitive strain GZ17 as recipient , but no transconjugant was obtained on the FY plates. Then , the 2.4kb *Hind*Ⅲ DNA fragment was ligated into sequencing vector pGEM-7Z(+) for sequencing. The result of sequencing and analysis showed that the 2.4kb DNA fragment contained three ORFs. According to the result of sequencing , further subcloning was conducted and 1.9kb *Hind*Ⅲ-*Sac* Ⅱ DNA fragment related to salt tolerance was obtained.

Key words : *Sinorhizobium meliloti* , Salt tolerance , Subcloning , Sequencing

* This project was supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China and European Commission INCO-DC Research Project(ERBIC18CT960103)

** Author for correspondence