

费氏中华根瘤菌 042BS 结瘤调节基因的克隆及功能检测*

张海瑜 张海予 李小红 温尚昆 杨苏声**

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)

摘 要:费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)042BS 可以在大豆和苜蓿上结瘤。用费氏中华根瘤菌 USDA257 的 *nodD1* 和 *nodD2* 基因分别作为探针,与 042BS 总 DNA 进行 Southern 杂交,发现其 DNA 经 *EcoRI* 酶切后分别在 3.0kb 和 6.0kb 处各有一条阳性带。回收这两条阳性带附近的 DNA 片段,建立部分基因文库,克隆到带有 *nodD1* 基因的 3.0kb 片段,以及带有 *nodD2* 基因的 6.0kb 片段。对 *nodD1* 和 *nodD2* 进行序列分析,结果表明 042BS 的 *nodD1* 与费氏中华根瘤菌根瘤菌 USDA257 和 USDA191 的同源性高达 99%,而 *nodD2* 与 USDA257 的同源性为 100%。再将 *nodD1* 的片段克隆到 pBBR1MCS-5 载体上,导入豌豆根瘤菌蚕豆生物变种(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)LPR5054 中进行功能检测,显示 042BS 的 *nodD1* 均可被大豆分泌的类黄酮物质染料木黄酮以及苜蓿分泌的类黄酮物质毛地黄黄酮所诱导。

关键词:费氏中华根瘤菌,结瘤调节因,克隆,功能

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2002) 01-0033-07

根瘤菌可与某些特定的豆科植物形成具有固氮能力的根瘤或茎瘤,这一共生固氮体系的建立受到共生体双方一系列基因的控制。根瘤菌中与结瘤过程有关的基因称为结瘤基因,包括 *nod*、*nol* 和 *noe* 基因。自 1982 年从苜蓿中华根瘤菌中得到第一个结瘤基因 *nodA* 以来,已鉴定了 64 个结瘤基因^[1]。按功能可将其分成结瘤调节基因、共同结瘤基因、寄主专一性结瘤基因和基因型专一性结瘤基因^[2]。*nodD* 是最主要的调节基因,它普遍存在于各种根瘤菌中。自由生长的根瘤菌 *nodD* 基因可组成型地表达少量无活性的 *nodD* 蛋白,当它接收到寄主植物分泌的信号分子(主要为类黄酮化合物)后,发生构象变化,进而诱导自身及其他结瘤基因的表达。不同根瘤菌含有不同的 *nodD* 基因,它们接受类黄酮诱导物的能力不同,因而在一定程度上决定了根瘤菌的寄主范围。研究表明,*nodD* 基因的突变或外源 *nodD* 基因的导入都可能扩大根瘤菌的寄主范围^[3,4]。有的根瘤菌含有多个 *nodD* 基因,如费氏中华根瘤菌含有 *nodD1* 和 *nodD2*^[5],而菜豆根瘤菌(*R. phaseoli*)和苜蓿中华根瘤菌都含有 3 个 *nodD* 基因^[1],它们的作用也不尽相同。

费氏中华根瘤菌 042BS 分离自新疆的苜蓿根瘤。它可在大豆和苜蓿上形成有效根瘤^[6]。本文试图通过对该菌株结瘤调节基因 *nodD1* 和 *nodD2* 的克隆、序列分析以及功能的初步研究,探讨其寄主范围的遗传机制。

* 国家自然科学基金(39870045)和欧盟科技合作基金项目(IC18CT970191)资助

** 通讯作者

作者简介:张海瑜(1973-),女,河南新乡市人,博士,主要从事微生物分子遗传学研究。

收稿日期:2001-05-11,修回日期:2001-06-28

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

列于表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Characteristic	Source
<i>S. fredii</i>		This laboratory
042BS	Wild type	
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Host for recombinant cosmids and plasmids	This laboratory
Plasmids		
pUC18	Sequencing vector, Ap ^r	
pBBR1MCS-5	Cloning and sequencing vector, Gm ^r	Kovach(1995)
pD13	USDA257 <i>nodD1</i> in pTZ19u, Ap ^r	Krishnan(1995)
pD26	USDA257 <i>nodD2</i> in pTZ19u, Ap ^r	Krishnan(1995)
pUCD1	3.0kb <i>EcoRI</i> fragment which contained <i>nodD1</i> of 042BS in pUC18, Ap ^r	This study
pUCD2	6.0kb <i>EcoRI</i> fragment which contained <i>nodD2</i> of 042BS in pUC18, Ap ^r	This study
pUCD1A	2.3kb <i>SalI</i> fragment containing <i>S. fredii nodD1</i> cloned into pBBR1MCS-5 for functional analysis, Gm ^r	This study
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i> LPR5045	pSym ⁻ , carrying pMP154 with the promoter of <i>nodA</i> controlling the <i>lacZ</i> gene. Chromosomal marker, Rif ^r Plasmid marker, Str ^r and Cm ^r	Leiden University, the Netherlands

1.2 培养基与抗生素

TY 培养基^[7]用于培养根瘤菌, LB 培养基^[8]用于培养大肠杆菌。筛选转化子所用氨苄青霉素浓度为 100 μ g/mL。培养大肠杆菌和根瘤菌的庆大霉素浓度分别为 10 μ g/mL 和 40 μ g/mL。福利平的浓度为 10 μ g/mL, 氯霉素的浓度为 5 μ g/mL, 链霉素的浓度为 500 μ g/mL。

1.3 DNA 操作技术

042BS 总 DNA 的提取参照文献[9]。探针的标记和检测按 B.M. 公司试剂盒说明书进行, PCR、Southern 杂交、质粒提取、酶切和克隆等方法按文献[8]进行。

1.4 探针的制备

以 pD13 为模板, 用引物 5' - TGATGACCGAACGCAAAC - 3' 和 5' - GAGACGCCTCCTG-TAGAA - 3' 扩增出 850bp 片段, 回收纯化后, 标记得到 *nodD1* 探针。以 pD26 为模板, 用引物 5' - GATGACAAAGCGAAGCGTTA - 3' 和 5' - ACAGCAAAGCGGGATTAGA - 3' 扩增出 650bp 片段, 回收纯化后, 标记得到 *nodD2* 探针。

2 结果和讨论

2.1 042BS *nodD1* 和 *nodD2* 基因的克隆

将 042BS 总 DNA 经 *EcoRI* 酶切后, 分别用 USDA257 的 *nodD1* 和 *nodD2* 探针进行

Southern 杂交。发现均有阳性杂交带,其中 *nodD1* 探针杂交的阳性带在 3.0kb 左右(图 1) 而 *nodD2* 探针杂交的阳性带是在 6.0kb 附近(图 2)。

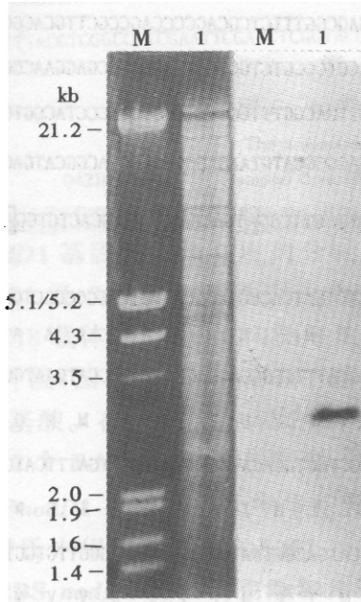


图 1 042BS 总 DNA *EcoRI* 酶切与 USDA257 *nodD1* 探针的 Southern 杂交

Fig.1 Southern hybridization of 042BS total DNA digested by *EcoRI* with probe of USDA257 *nodD1* from pD13

M:λDNA/*EcoRI* + *HindIII* marker;

1:042BS total DNA/*EcoRI*.

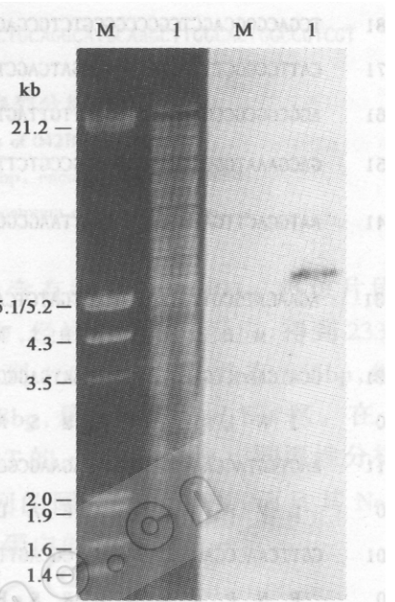


图 2 042BS 总 DNA 经 *EcoRI* 酶切与 USDA257 *nodD2* 探针的 Southern 杂交

Fig.2 Southern hybridization of 042BS total DNA digested by *EcoRI* with probe of USDA257 *nodD2* from pD26

M:λDNA/*EcoRI* + *HindIII* marker;

1:042BS total DNA/*EcoRI*.

用 *EcoRI* 大量酶切 042BS 的总 DNA,然后分别回收 3.0kb 和 6.0kb 附近的 DNA 片段,使之与 pUC18 连接,建立部分基因文库。再分别用 *nodD1* 和 *nodD2* 探针与在 X-gal 平板上筛选得到的白斑菌落进行菌落原位杂交,得到的阳性克隆。定名为 pUCD1 和 pUCD2。这两个质粒经内切酶酶切分析,再将酶切的片段与探针进行 Southern 杂交后,确定出 *nodD1* 和 *nodD2* 基因所在的位置,制作出遗传图谱(图 3, 图 4)。

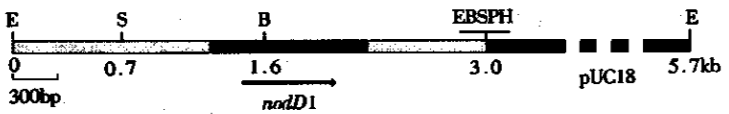


图 3 pUCD1 的遗传图谱

Fig.3 Genetic map of pUCD1

E: *EcoRI*; S: *SalI*; B: *BamHI*; P: *PstI*; H: *HindIII*.

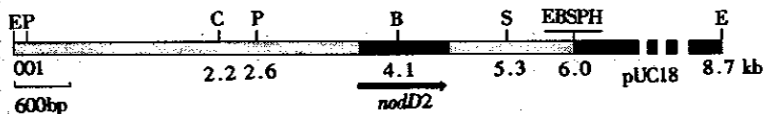


图 4 pUCD2 的遗传图谱

Fig.4 Genetic map of pUCD2

E: *EcoRI*; S: *SalI*; B: *BamHI*; P: *PstI*; H: *HindIII*.


```

2071 AGATGCCCTCAATTGAGTTGCTCACTTTGGAGTTGAGCTGTATCAAACGGGTGCCCTCGACAAAGGCCATATTCGATATAGCAGATCCCAG
2161 TAAATCATTAGGTGAAACGATCCTTCACCAGGAGTAAGTGTGTTGAGTATTGCCCTGAGAAGAAAAGAGCCAAAGCGAACGCTGTGGATA
2251 TTTACGTCGGCCGTCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTCTAGAGTCGACCTCGACGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGCTCGT

```

图 5 *nodD1* 的核苷酸和蛋白质序列分析

Fig. 5 The nucleotides and amino acid sequences of 042BS *nodD1*

042BS *nodD1* gene started from 636bp and terminated at 1601bp, encoded 321 amino acids.

There is a well-defined *nod* box (highlighted) located at upstream of the start codon.

2.2 *nodD1* 基因的克隆与序列分析

pUCD1 经 *SalI* 酶切后得到一个 2.3kb 片段, 该片段含有完整的 *nodD1*。将该片段克隆到 pUC18 载体上, 采用双向测序法, 设计合成 2 个引物, 经过 4 次测序反应, 得到 2338bp 的 *SalI* 片段(图 5)。其中 *nodD1* 基因是从 636bp 起始到 1601bp 终止, 共有 965bp, 编码 321 个氨基酸。在 *nodD1* 的起始密码的上游 - 10 到 - 58bp, 是保守的 *nod* box 区。在 *nod* box 中有 2 个 T-N₁₁-A 的 LysR 序列, 以及 2 个 ATC-N₉-GAT 的 *nod* box 基序。同源性分析表明, 042BS *nodD1* 基因与费氏中华根瘤菌 *nodD1* 基因序列的同源性为 99%, 而且其 NodD1 蛋白与费氏中华根瘤菌 USDA257 和 USDA191 的 NodD1 蛋白的序列完全一致。

2.3 042BS *nodD2* 基因的克隆和序列分析

pUCD2 经 *Bam*HI 酶切成 6.8kb 和 1.9kb 的 2 个片段, 在这 2 个片段上都带有部分的 *nodD2* 基因。将其中的 6.8kb 片段自连, 而将另一段 1.9kb 片段克隆到 pUC18 载体上。通过酶切确定出其插入的方向。然后利用引物将这两个质粒靠近 *nodD2* 一端分别进行序列分析, 共得到一个 1301bp 的长度的测序结果(图略)。对该序列进行测序发现, *nodD2* 基因从 239bp 起始到 1177bp 终止, 共有 939bp, 编码 312 个氨基酸。在 *nodD2* 上游, 未发现保守的 *nod* box 序列。序列分析表明, 042BS 的 *nodD2* 基因与费氏中华根瘤菌的 *nodD2* 基因序列的同源性为 100%。

上述结果表明, 042BS 所含 *nodD1* 和 *nodD2* 的核苷酸序列与已知费氏中华根瘤菌 *nodD1* 和 *nodD2* 基因高度同源, 这也从侧面支持了对 042BS 分类地位的结果^[6]。

2.4 042BS NodD1 蛋白质的功能检测

对 042BS NodD1 蛋白质的检测是在 *R. leguminosarum* *bv. viciae* LPR5045 (pSym⁻, pMP154) 中进行的。由于该菌不含共生质粒, 因而消除了其本身的 *nodD* 对检测的影响, 同时该菌携带有 pMP154, 它含有受 *nodA* 启动子控制的 *lacZ* 基因 (*nodDA* :: *lacZ*), 所

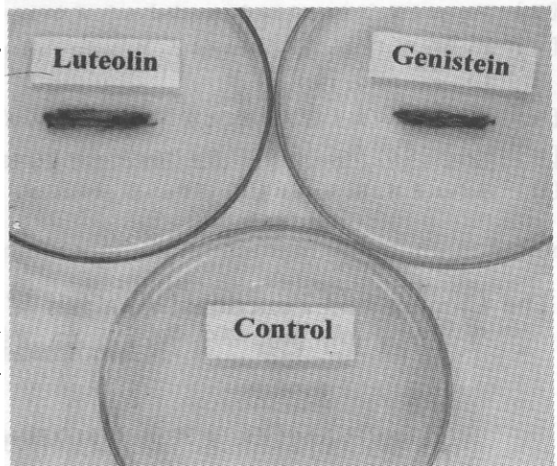


图 6 染料木黄酮和毛地黄黄酮诱导 pUCD1A 在 X-gal 平板的颜色反应

Fig. 6 pUCD1A induced by genistein and luteolin on FY medium containing X-gal

Genistein: Induced by genistein; Luteolin: Induced by luteolin; Control: Without inducer.

以,通过检测 *lacZ* 的表达可反映 *nodD1* 对结瘤基因的转录激活。

首先将带有完整 042BS *nodD1* 的 2.3kb *SalI* 酶切片段克隆到 pBBR1MCS-5 上,得到重组质粒 pUCD1A。然后用三亲本杂交将 pUCD1A 导入 LPR5045 中,在含有 Gm、Cm 和 Rif 的 FY 平板上筛选出接合子,并在加有染料木黄酮和毛地黄黄酮的 FY 平板上进行类黄酮的诱导试验。结果表明,接合子均呈蓝色,而对照呈很淡的兰色(图 6)。染料木黄酮和毛地黄黄酮分别是由大豆和苜蓿幼苗分泌的主要类黄酮诱导物。该试验表明,042BS NodD1 蛋白可分别受苜蓿和大豆分泌的类黄酮物质诱导,并激活其他结瘤基因的转录。这一特性有利于 042BS 与苜蓿建立共生关系。所以,此结果与费氏中华根瘤菌根瘤菌 042BS 可以在大豆和苜蓿上结瘤的现象是一致的^[6]。然而,尽管 042BS 与已知的费氏中华根瘤菌 USDA257 和 USDA191 的 NodD 蛋白序列完全一致,但这两个菌株均不能在苜蓿上结瘤^[10,11]。这个现象表明,042BS 能在苜蓿上结瘤可能具有其他的结瘤机制,有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Spalink H P, Kondorosi A, Hooykaas P J, et al. The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. London: Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [2] Hungria M, Pueppk S G. *Soil Biol Biochem*, 1997, 29: 819 ~ 830.
- [3] McIver J, Djordjevic M A, Weinman J J, et al. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1989, 2: 97 ~ 106.
- [4] Bassam B J, Djordjevic M A, Redmond J W, et al. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1988, 1: 161 ~ 168.
- [5] Appelbaum E R, Thompson D V, Idler K, et al. *J Biotechnology*, 1988, 170: 12 ~ 20.
- [6] 张海瑜,张海予,李小红,等,微生物学报,2001,41(2):127 ~ 133.
- [7] Vincent J M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [8] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: A Laboratory manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 林万明. 分析微生物学专辑. 北京: 科学出版社, 1988: 88 ~ 89.
- [10] Pueppke S G, Broughton W J, *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12(4): 293 ~ 318.
- [11] Hashem F M, Kuykendall L D, El-Fasly G. *Symbiosis*, 1997, 22: 255 ~ 264.

The Cloning and Functional Analysis of *Sinorhizobium Fredii* 042BS Regulatory Modulation Genes*

Zhang Haiyu Zhang Haiyu Li Xiaohong Wen Shangkun Yan Susheng**

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

Abstract: The total DNA of *Sinorhizobium fredii* 042BS was digested by *EcoRI* for Southern blotting with probes of *nodD1* and *nodD2* from *S. fredii* USDA257. The 3kb positive band hybridized with *nodD1* probe and 6kb positive band with *nodD2* probe were found, respectively. Partial gene library were constructed using pUC18 as vector, and the clones with the *nodD1* and *nodD2* genes were obtained. The sequence of *nodD1* and *nodD2* of 042B showed that they are highly homologous

with *nodD1* and *nodD2* of *S. fredii*. The fragment with *nodD1* was cloned into the vector pB-BRIMCS-5 and introduced into *R. leguminosarum bv. viciae* LPR5054 to study the function of the *nodD1*. The results showed that *nodD1* of 042B can be induced by genistein and luteolin secreted by the seedlings of soybean and alfalfa respectively.

Key words: *Sinorhizobium fredii*, Regulatory nodulation gene, Cloning, Function

* This work was funded by National Natural Science Foundation of China (No.39870045) and European Commission INCO-DC Research Project(IC18CT970191)

** Author for correspondence