

与慢生大豆根瘤菌吸氢和固氮作用有关的基因克隆*

周路明 宁林夫 陈玲京 王子芳 岑英华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

用 Tn5 插入导致的 T-1(His⁻Hup⁻Fix⁻) 变株为受体, 从慢生大豆根瘤菌 USDA 110 基因文库中钓取 His⁺ 结合子 10 株, 经检测, 它们都不同程度地恢复了 Hup⁺ 与 Fix⁺ 功能, 从它们的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图上, 可见到都有一个分子量大小各异的 pLAFRI::his 质粒, 其中 5 株接合子的重组质粒已转入 *E. coli* HB101 中, 从它们的质粒电泳图型再显示其分子量各有差异, 经 Southern 转移之后, 分别用 hup 探针和 nif 探针进行 DNA 杂交分析, 明确 EC₁ 菌株的质粒能与 hup 和 nif 探针杂交, EC₂ 菌株的质粒能与 hup 探针杂交, 其它三株虽能解除 Hup⁻ Fix⁻ 功能上的缺陷, 但其质粒 DNA 序列上并无与 nif 或 hup 序列有同源性的成份。

关键词 根瘤菌; 质粒; 克隆; 探针

Friedman 等^[1]构建的 Cosmid pLAFRI 质粒并用此系统构建苜蓿根瘤菌 *Rhizobium meliloti* 基因组文库, 进而首先获得了快生型根瘤菌的 nif KDH 基因及 nod 基因克隆体。充分表现了这个系统对分离 G⁻ 细菌的特殊功能基因的有效性。

马庆生利用这一系统完成了对豌豆根瘤菌 *R. leguminosarum* Sym 质粒上结瘤 (nod) 与固氮 (fix) 基因的克隆与分析^[2]。

Evans 实验室^[3,4], 利用这个系统构建慢生大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* 基因库, 从中钓得了几个能补偿变株 PJ17 Hup⁻ 表型的基因片段。Hom 等^[5]也利用这一系统的工作原理, 分离了一段与大豆根瘤菌 Hup 和 Fix 功能都有关的 DNA。

最近 Kennedy 等^[6]构建了棕色固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 的 pLAFRI 基因库, 从中获得含 nif 基因的克隆片段。

我们曾用转座子 Tn5 插入诱变慢生大豆根瘤菌, 分离了 4 株 His⁻Hup⁻Fix⁻

的营养缺陷与共生缺陷相关连的变株^[6a]。为我们钓取目的基因 hup 或 fix 创造了有利条件。

本文报道用 His⁻Hup⁻Fix⁻ 变株 T-1 作为杂合质粒受体, 从 USDA 110/pLAFRI 基因库中钓取能补偿缺陷的有关基因克隆体的结果。

材料和方法

(一) 菌株和质粒

见表 1。

(二) 培养条件

1. 培养基: 培养大肠杆菌用 LB 培养基; 培养慢生大豆根瘤菌用 YM 培养基; 选择缺陷型用 M 培养基; 细菌杂交予培养用 TY 培养基; 质粒分离予培养根瘤菌用 PA 培养基, 培养基成分见文献^[7]; 检测慢生大豆根瘤菌 *in vitro* 吸氢作用的 SM 培养基成分见[6]。

2. 抗生素: 硫酸链霉素 (Sm), 硫酸卡那霉素 (Km), 盐酸四环素 (Tc), 氨基青霉素 (Ap) 均为国产注射剂, 氯霉素为 Sigma 产品。各种抗生素根据不同变株的选择要求加到培养基中。

本文于 1987 年 11 月 11 日收到。

* 本项工作获得国家自然科学基金资助。

表1 细菌菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmid

菌株或质粒 Strain or plasmid	特征 Characteristics	来源 Source
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 USDA 110 GL T-1	wild type Nod ⁺ Nif ⁺ Hup ⁺ 带有 pLAFRI 的基因库 USDA 110 genomic library with pLAFRI K _m ^R S _m ^R His ⁻ Hup ⁻ Fix ⁻ Derivative of 110 inserted by Tn5	From J. S. Hu Evans ^[3,4] [6a]
C ₁ T-1 (pLAFRI::C ₁) C ₂ T-1 (pLAFRI::C ₂) C ₃ T-1 (pLAFRI::C ₃) C ₄ T-1 (pLAFRI::C ₄) C ₅ T-1 (pLAFRI::C ₅)	K _m ^R S _m ^R T ₂ ^R His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺ K _m ^R S _m ^R T ₂ ^R His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺ K _m ^R S _m ^R T ₂ ^R His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺ K _m ^R S _m ^R T ₂ ^R His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺ K _m ^R S _m ^R T ₂ ^R His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺	This study This study This study This study This study
<i>E. coli</i> HB101 EC ₂ HB 101 (pLAFRI::his) EC ₃ HB 101 (pLAFRI::his) EC ₄ HB 101 (pLAFRI::his) EC ₅ HB 101 (pLAFRI::his hup nif) EC ₆ HB 101 (pLAFRI::his)	ara gal lac leu pro xyl SupE S _m ^R recA hsdR hsdM S _m ^R T ₂ ^R S _m ^R T ₂ ^R S _m ^R T ₂ ^R S _m ^R T ₂ ^R S _m ^R T ₂ ^R	[6] This study This study This study This study This study
Plasmid pLAFRI pRK2013 pHV116 pSA30	T ₂ ^R mob ⁺ tra ⁻ lac. Pl. Helper plasmid for mobilization of (pLAFRI::C) K _m ^R tra ⁺ A ₅ ^R hup gene probe T ₂ ^R nif KDH probe	From Q. S. Ma ^[2] [8] From Dr. Ausubel, F. M.

3. 培养温度: *E. coli* 用 36—37℃, 慢生大豆根瘤菌在 28℃ 培养。

(三) pLAFRI 质粒的转移方法

1. 利用 pRK2013 的帮助进行三亲本细菌杂交: 以 pLAFRI 为载体的 USDA 110 基因文库中能补偿 His⁻ 缺陷的基因片段的细菌杂交方法: T-1 变株在 TY 培养基上培养 3 天, *E. coli* pRK2013 在 LB 液体培养基过夜, 基因文库中的 *E. coli* 群体在 LB 液中增殖 2—2.5h, 然后按文献[5]法作三亲本杂交, 菌细胞过滤在滤膜上, 用 TY 平板培养 2 天, 用 8 ml 水洗脱滤膜上的细胞, 以 0.1ml/皿涂布 YM (Sm 200μg/ml, Tc 120μg/ml) 选择平板, 首先选出 T-1 (pLAFRI) Tc^R 结合子, 然后再影印到含 Sm 200μg/ml, Tc 120μg/ml 的 M 培养基平板上, 以选取能补偿 His⁻ 缺陷

克隆的 C 系列菌株。

2. pLAFRI::his⁻ 质粒从慢生大豆根瘤菌 C 系列变株中转移到 *E. coli* HB 101 的三亲本杂交方法: 大豆根瘤菌变株培养在 20ml TY 液中, 150r/min 摇动 2 天, 取 1.5ml 加到 0.5ml 对数生长期的 *E. coli* (pRK2013) 混合, 静止培养 2 天, 再加入 3ml 对数生长期的 *E. coli* HB 101, 混合均匀, 过滤到滤膜上, 置 TY 平板培养 2 天, 无菌水洗脱, 菌悬液涂布在含 Tc 20μg/ml LB 平板上, 37℃ 培养选择出结合子, 编号为 EC 系列。

(四) 大豆根瘤菌 *in vitro* 吸氢活性的测定按文献[6]进行。共重复测定三批, 每批每号菌种用三管。

(五) 结瘤试验及根瘤的固氮和吸氢活性的测定

大豆品种为六月爆(鄂豆 2 号), 砂培方法按文献[9]进行。播种后 50 天采集根瘤作根瘤吸氢功能及固氮活性(乙炔还原法)的测定^[9]。

(六) 大豆根瘤菌质粒的分离

参照 Hirsch^[9,10] 的方法进行, 但作如下修改: 只用 50ml PA 培养基, 提得的 DNA 粗制品加入 1/50(V:V) 的 5mol/L NaCl, 然后用氯仿-苯酚(1:1)抽取一次, 即可进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 分离质粒。

(七) 大肠杆菌质粒的分离

按文献[7]的方法进行。

(八) 探针 DNA 的分离

参考 Holmes^[11] 的方法进行。

(九) DNA-DNA 分子杂交

按文献[7]的方法进行。

结 果

(一) 能互补 His⁻ 缺陷的 Cosmid 克隆的分离

通过三亲本杂交方法获得 T-1 变株(带有 pLAFRI 克隆的结合子), 其转移频率为 $0.5 \times 10^{-3} - 10^{-2}$, 然后用影印法得到 His⁺ 菌落, 纯化并检查它们的 Tn5 和 S_m^R K_m^R 的存在。由于 M 培养基成份和 Sm 为 200 μg/ml 两个条件完全可以消除 *E. coli* 生长, 而 M 培养基及 Tc 为 120 μg/ml 两个条件又可排除受体菌 T-1 的干扰。因此 His⁺ Tc^R 两个基因同时发生突变的机率在 $10^{-15} - 10^{-16}$ /细胞。试验共选出带 S_m^R K_m^R His⁺ 的结合子 10 株, 即 T-1(pLAFRI::his) 编号为 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉ 和 C₁₀₀。

(二) C 系列的 T-1 结合子吸氢活性

所测 10 株 C 系列结合子在培养状态下都显出吸氢活性。其吸氢速率与野生型亲株 USDA 110 一样强, 大都测不到氢峰的存在, 说明 H₂ 已完全被利用, 而作为空白对照的培养基斜面或 T-1 Hup⁻ 的菌株其 H₂ 峰仍保持在 160—180mm 范围。

(三) C 系列 T-1(pLAFRI::his) 结合子的固氮活性

用灭菌砂培法观察 C 系列 10 个结合子在共生固氮中的反应。各号结合子生长在选择性培养基中, 作悬液接种鄂豆二号萌芽。播种 50 天采集根瘤, 作放 H₂ 与乙炔还原检测。结果发现, C₃ 结瘤个体较小, 固氮活性很低。其余的 9 株固氮活性(乙炔还原法)与亲株 USDA 110 相近。恢复了 Fix⁺ 的功能。

(四) C 系列 T-1 杂合质粒存在的物理证明

按本实验室建立的根瘤菌质粒分离的方法^[9] 检测慢生大豆根瘤菌 USDA 110, T-1 都没有质粒, 但 C 系列的结合子都携带有一个质粒, 其分子量比 pLAFRI 大(图 1)。

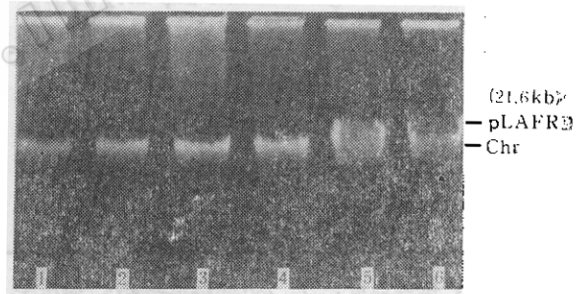


图 1 C 系列重组质粒图谱

Fig. 1 The recombinant plasmid profiles of C system strains

1. C₂; 2. C₃; 3. C₆; 4. C₇; 5. C₉ 为慢生大豆根瘤菌中的重组质粒 The recombinant plasmids of pLAFRI::his in *Bradyrhizobium japonicum*; 6. 载体质粒 Vector plasmid pLAFRI

(五) 慢生大豆根瘤菌的 C 系列 T-1 杂合质粒转移到 *E. coli* HB 101

将 C 系列的结合子的 C₂、C₃、C₆、C₇、C₉ 五株菌分别作为质粒的供体通过 pRK2013 帮助, 用三亲本杂交法将各自杂合质粒转到 *E. coli* HB 101 中。成功的关键是延长接触时间, 如 C 系列菌株与 pRK2013 先

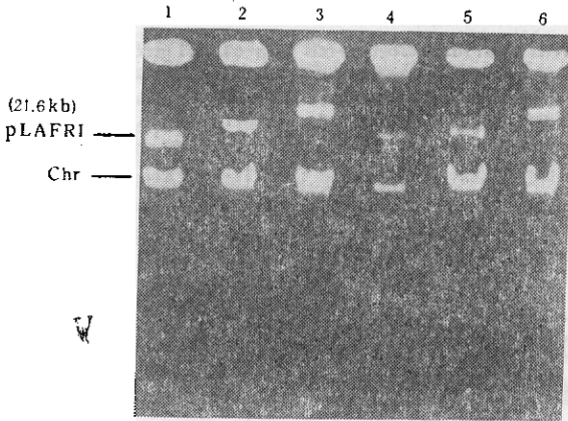


图 2 EC 系列重组质粒图谱

Fig. 2 The recombination plasmid profiles of EC strains

1. 载体质粒 pLAFRI; 2. EC₂; 3. EC₅; 4. EC₆; 5. EC₇; 6. EC₉, 大肠杆菌中 pLAFRI::his 重组质粒 the recombinant plasmid of pLAFRI::his in *E. coli*

接触 2 天, 然后洗脱, 悬浮、涂平板选择。结合转移的频率约为 1×10^{-4} /受体细胞。根据供体的编号, *E. coli* HB 101 的结合子分别编号为 EC₂、EC₅、EC₆、EC₇ 和 EC₉。杂合质粒 (pLAFRI::his hup fix) 转入 *E. coli* 中, 为分离提取分析所克隆的慢生根瘤菌 DNA 片段提供了很大方便。

(六) EC 系列菌株中 (pLAFRI::his hup fix) 质粒存在的物理证明

用快速法分离 *E. coli*、EC₂、EC₅、EC₆、EC₇、和 EC₉ 及 pLAFRI 质粒, 经琼脂糖凝胶电泳检测, EC 菌株都有一条分子量比 pLAFRI 大的质粒。各个克隆之间的分子量不太一致(图 2)。

(七) hup、nif 探针杂交

上述质粒的琼脂糖凝胶电泳经 Southern 吸印转移之后, 分别用 ³²P 标记的 hup 探针或 nif KDH 探针进行 DNA-DNA 分子杂交检查。放射自显影的结果分别见图 3、图 4。各变株表型和探针杂交结果列于表 2。根据阳性结果判读, EC₇

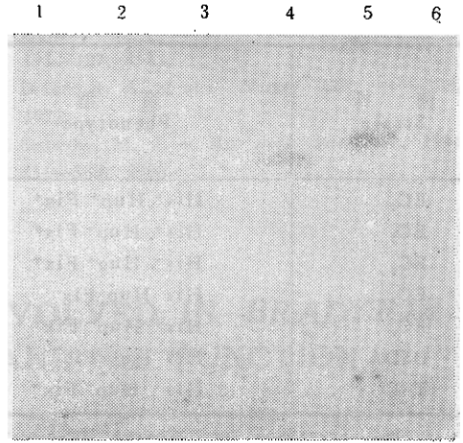


图 3 hup 探针与重组质粒杂交放射自显影图

Fig. 3 Hybridization with hup probe
1. The vector plasmid pLAFRI; 2. EC₂-negative; 3. EC₅-negative; 4. EC₆-positive; 5. EC₇-positive; 6. EC₉-negative

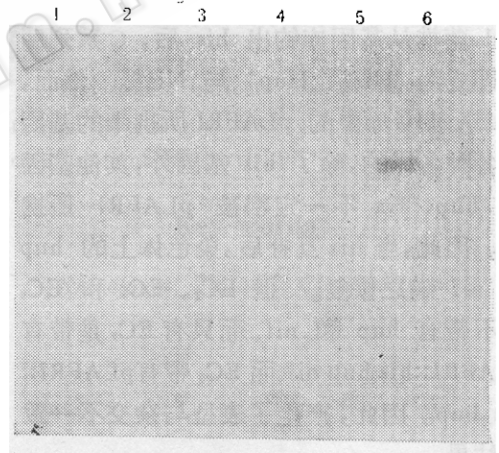


图 4 nif 探针与重组质粒杂交放射自显影图

Fig. 4 Hybridization with nif probe
1. The vector plasmid pLAFRI; 2. EC₂-negative; 3. EC₅-negative; 4. EC₆-negative; 5. EC₇-positive; 6. EC₉-negative

菌株所含的杂合质粒能与 nif KDH 及 hup 探针起反应, 即 EC₇ 携带杂合质粒 (pLAFRI::his hup fix)。而 EC₆ 菌株所携带的质粒除互补 His⁺ 外, 还与 hup 基因探针起反应, 其可表示为 (pLAFRI::his hup) 其它的 EC₂、EC₅ 和 EC₉ 都没有表现

表 2 重组质粒与 *hup*、*nif* 探针杂交结果Table 2 Transconjugants plasmid detected by DNA hybridization with *hup* or *nif* probe

菌株 Strain	表型 Phenotype	重组质粒 Recombinant plasmid	DNA 杂交 Hybridization with	
			<i>hup</i>	<i>nif</i>
EC ₂	His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺	+	-	-
EC ₁	His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺	+	-	-
EC ₃	His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺	+	+	-
EC ₇	His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺	+	+	+
EC ₈	His ⁺ Hup ⁺ Fix ⁺	+	-	-
USDA	His ⁻ Hup ⁻ Fix ⁻	-	-	-
T-1	His ⁻ Hup ⁻ Fix ⁻	-	-	-

与 *hup* 或 *nif* KDH 探针有阳性反应的迹象。但其功能表现都有 Hup⁺、Fix⁺ 的表型。此结果说明，在亲株慢生型大豆根瘤菌 USDA 110 中 *his*、*hup* 和 *fix* 是连锁的。当 Tn5 插入居上游的 *his* 位点，*his* 受阻而钝化，与此同时，*hup* 和 *nif* 随之钝化。T-1 菌株从基因库钓出 *his* 后，C 系列菌株即成为 His⁺、Hup⁺ 与 Nif⁺。然而，USDA 110 库中的 pLAFRI 所携带的基因是各种各样的，除了 *his* 基因外，其他基因如 *hup*、*fix* 不一定都被 pLAFRI 所携带。因此，当 *his* 互补后，染色体上的 *hup* 与 *nif* 随之恢复。但 EC₂、EC₁ 和 EC₃ 并不带有 *hup* 和 *nif*，而只有 EC₇ 是带有 pLAFRI::*his hup nif*，而 EC₈ 带有 pLAFRI::*his hup*。因此，产生了表型与杂交不一致的结果。

讨 论

要完成生长很慢的大豆根瘤菌与生长很快的 *E. coli* 两型细胞之间的三亲本杂交是不太容易的。所介绍的方法都是经过许多探索和比较后得出的。尤其是将慢生大豆根瘤菌中 pLAFRI::*his* 杂合质粒转移到 *E. coli* HB 101 中，控制根瘤菌与 *E. coli* 的细胞量之比为 4:1，使用 *E. coli* 生长较慢的 TY 培养基及 28℃ 静止

培养，延长接触时间至 48h，都属于关键技术条件。

研究控制结瘤、固氮、吸氢等特殊功能的基因是固氮微生物遗传学研究中最受人们注意的课题。其中 *his* 与 *nif* 相连接是最早为人们认识的^[12]。以后从不同的材料上，各自提到了 *hup*-*fix*^[13]，*his*-*nod*^[12] 等存在一定的相关性。我们实验室曾证明了 Tn5 插入造成的 His⁻ 变株同时波及到吸氢 (Hup) 与固氮 (Fix) 功能的表达，一旦由于 Tn5 切离自然回变 His⁺ 者，皆同时成为 Hup⁺ Fix⁺。现在我们导入 pLAFRI::*his* 的重组质粒到该变株内，亦能将 His⁻ Hup⁻ Fix⁻ 缺陷矫正。这再次证明根瘤菌中 *his hup nif* 或 *fix* 各基因间在遗传调控与基因的结构上存在密切关系。

参 考 文 献

- [1] Friedman, A. M. et al.: *Gene*, 18: 289—296, 1982.
- [2] Ma, Q. S. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 187: 166—171, 1982.
- [3] Cantrell, M. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 181—185, 1983.
- [4] Lambert, G. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3232—3236, 1985.
- [5] Hom, S. S. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 161: 882—887, 1986.
- [6] Kennedy, C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 205:

- 318—325, 1986.
- [6a] 陈路京等：微生物学报, 26(4): 321—324, 1986。
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. p. 387, 1982.
- [8] Nelson, L. M. et al.: *FEMS, Microbiol. Letters*, 30: 53—58, 1985.
- [9] 宁林夫等：遗传学报, 13(1): 1—10, 1986。
- [10] Hirsch, P. R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 120: 403—412, 1980.
- [11] Holmes, D. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 114: 193—197, 1981.
- [12] Dixon, R. A. et al.: *Nature*, 237: 102—104, 1972.
- [13] Sadwsky, M. J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 114: 334—339, 1986.

CLONES OF THE DNA REGION INVOLVED IN *BRADYRHOZBIUM JAPONICUM* HUP AND FIX FUNCTION

Zhou Luming Ning Linfu Chen Luoqing

Wang Zifang Cen Yinghua

(Wuhan Institute of Virology Academia Sinica, Wuhan)

Ten pL AFRI cosmid clones carrying the His Hup Fix region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome were isolated from a gene library of *B. japonicum* USDA 110 by complementation of a His⁻ Hup⁻ Fix⁻ mutant of *B. Japonicum* USDA110. Five of these recombinant plasmids were transferred into *E. coli* HB101 for further study. Using hup and nif probes, a plasmid containing a DNA region hybridizing with hup and nif probes, another plasmid containing a DNA region hybridized only with hup probe were

detected. Though the others did not hybridize with hup or nif probe, they did restore the Hup⁺ Fix⁺ function in His⁻ Hup⁻ Fix⁻ mutant.

The results indicate that we have cloned at least three kinds of gene fragments coding for Hup and Fix activity.

Key words

Rhizobium; Plasmid; Clone; Probe