

紫云英根瘤菌结瘤基因的定位研究*

魏 辉

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

李 卓 棣

(华中农业大学土化系, 武汉)

以根瘤菌 *nod ABC* 基因的结构同源性为依据, 对紫云英根瘤菌结瘤基因 (*nod*) 进行了定位。结果表明, 紫云英根瘤菌菌株 7653R 的 *nod* 基因同时存在于小质粒 pRa7653Ra 和大质粒 pRa7653Rb 上; S52 的 *nod* 基因位于小质粒 pRa52a 上; SR72 的 *nod* 基因单拷贝位于小质粒 pRa72a 上, 含有部分 *nod ABC* 基因的 BamHI、HindIII 和 PstI 酶切片段分别为 22.4 kb、11.9kb 和 2.2kb, EcoRI 酶切片段为 4.6kb 和 3.0kb; HR104 的 *nod* 基因也是单拷贝, 仅存在于小质粒 pRa104a 中, 含有部分 *nod ABC* 基因的 BamHI、EcoRI 和 PstI 酶切片段分别为 22.4kb、9.1kb 和 2.2kb。

关键词 紫云英根瘤菌; 结瘤基因; 质粒

紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*) 与我国南方特有的绿肥及蜜源作物紫云英 (*Astragalus sinica*) 形成有效共生固氮体系。有关它的共生固氮遗传学研究起步较晚。依据部分紫云英根瘤菌菌株的结瘤性状不稳定, 李卓棣等推测其结瘤功能与质粒有关。利用吡啶橙和热处理诱变紫云英根瘤菌, 得到了一些不结瘤 (*Nod*⁻) 突变株, 这些突变株均消除了一条较大质粒带^[1-3], 进一步表明紫云英根瘤菌的结瘤基因可能位于质粒上, 但都没有直接的实验证据。

在其它根瘤菌对豆科植物侵染和结瘤研究中, 通过质粒转移与消除、缺失定位、异源杂交、DNA 序列分析和 *Nod*⁻ 突变株功能互补研究, 人们发现除百脉根根瘤菌及少数快生型大豆根瘤菌的 *nod* 基因位于染色体上外, 大多数快生型根瘤菌的 *nod* 基因都位于质粒上^[4-7], 且有一段高度保守区域即共同结瘤基因 *nod ABC*^[8-10], *nod A*,

B, C 连接在一起且转录方向相同。

本研究以根瘤菌 *nod ABC* 基因结构保守性为依据, 利用苜蓿根瘤菌 *nod ABC* 基因片段作为探针, 对紫云英根瘤菌部分菌株的 *nod* 基因进行了定位。

材料和方法

(一) 菌株、质粒和培养条件

菌株与质粒见表 1。

E. coli 菌株用 LB 培养基, 37℃; 根瘤菌保藏用常规 YMA 培养基, 活化用 TY 培养基, 质粒分离培养用 PA 培养液^[11], 28℃。

(二) 质粒检测

对常规的根瘤菌快速检测方法^[12]进行了改进, 一是将琼脂凝胶浓度从 0.65% 降低到 0.40%。二是用改进的电场倒转电

本文于 1988 年 11 月 22 日收到。

* 本研究承蒙陈华荣教授指导, 曾得到张忠明、阮小安、王常霖和沈辉同志的帮助, 在此一并致谢。

表 1 试验菌株与质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株与质粒 Strain & plasmid	有关性状 Relevant characteristics	来源 Reference
<i>R. astragalii</i>		
7653R	wild type, Nod ⁺ Fix ⁺	[3]
7653R1	Nod ⁻ derivative of 7653R	[3]
S52	wild type, Nod ⁺ Fix ⁺	[3]
S52-S2	Nod ⁺ Fix ⁻ derivative of S52	[3]
SR72	wild type, Nod ⁺ Fix ⁻	[1]
HR104	wild type, Nod ⁺ Fix ⁻	[11]
<i>R. phaseoli</i>		
3622-15	derivative of RCR3622	[12]
<i>R. fredii</i>		
USDA205	wild type, Nod ⁺ Fix ⁺	[13]
plasmid		
pRmSL42	<i>nod ABC</i> genes of <i>R. meliloti</i> cloned in pBR325	[14]

泳(即 FIGE)取代常规电泳,电泳装置为本室与中国地质大学测试中心研制的“电泳仪电脑控制器”,该控制器能以可调频率提供周期性变化电场:正向电场—无电场—反向电场—无电场。电泳条件为:0.40%琼脂糖凝胶倒转电场电泳,倒转频率为35秒:2秒:5秒:2秒,50V(1.6V/cm)1小时,140V(4.6V/cm)9小时。

(三) 总 DNA 和质粒 DNA 提取

根瘤菌总 DNA 提取同文献[6]。质粒 DNA 的粗提取参见改进的 Hirsch 碱法^[15],纯化用 CsCl 密度梯度离心。

(四) 酶切

内切酶 BamHI, EcoRI, PstI (购自华美生物工程公司), HindIII (购自友谊医学科技开发公司)。缓冲液根据厂家推荐条件。本工作对总 DNA 和质粒 DNA 进行了完全酶切,每微克 DNA 用 10 单位内切酶,37℃,5 小时。0.70% 琼脂糖凝胶电泳,50V(1.6V/cm)9 小时。

(五) Southern 转移及分子杂交

Southern 转移用常规方法进行,只是对于根瘤菌大质粒,在碱变性之前,先让

凝胶在紫外检测仪上接受紫外线照射处理 20min, 然后进行酸处理(0.25 mol/L HCl, 10min, 两次), 使大质粒断裂, 提高转移效率。

³²P 为英国 Amersham 公司产品, 配备有药盒, 缺刻翻译按说明进行。

杂交液为: 50% 甲酰胺—5×Denhardt 液—5×SSPE—0.1% SDS—100 μg/ml 单链 DNA, 预杂交为 40℃, 杂交为 40℃(24—48 小时)。杂交膜取出后, 先用 2×SSC 室温洗脱两次, 然后用 2×SSC—0.5% SDS 洗脱, 50℃(根瘤菌大质粒的杂交膜)或 65℃(酶切片段杂交膜), 3—4 次, 每次 15min。放射自显影用上海感光胶片厂生产的 X 光片, 压片(-70℃)数小时至一个月后, 冲洗底片。

结 果

(一) 紫云英根瘤菌质粒与 *nod* 基因探针的杂交

重组质粒 pRmSL 42 含有苜蓿根瘤菌菌株的 *nod ABC* 基因片段, 以该质粒为探针, 对紫云英根瘤菌菌株 7653R、7653R1、

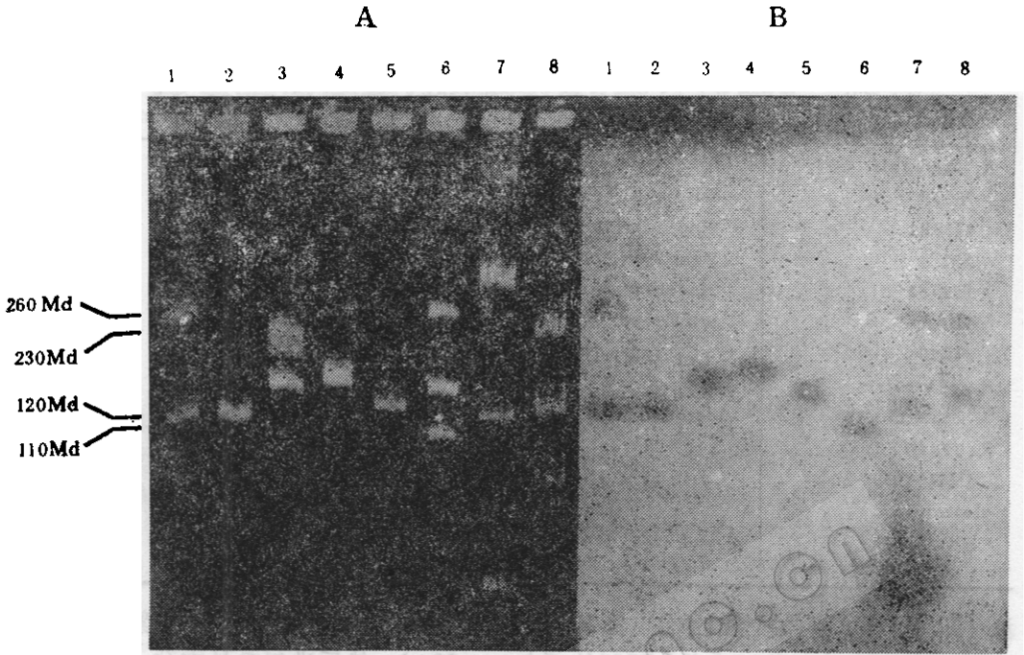


图1 紫云英根瘤菌结瘤基因的定位

A为质粒电泳图谱; B为质粒与 ^{32}P -pRmSL42 杂交的放射自显影。

Fig. 1 Location of the nodulation genes in *R. astragali*

(A) Plasmid pattern of the strains and (B) hybridization pattern of the plasmids with ^{32}P -pRmSL42. Lane 1. 7653R; lane 2. 7653R1; lane 3. S52; lane 4. S52-S2; lane 5. SR72; lane 6. HR104; lane 7. *R. phaseoli* strain 3622-15; lane 8. *R. fredii* strain USDA205.

S52、S52-S2、SR72 和 HR104 的 *nod* 基因进行了定位,结果见图 1。

六个紫云英根瘤菌菌株的较小质粒带都与 pRmSL42 有强杂交。7653R 的 *nod* 基因同时位于两条质粒 pRa7653Ra (120 Md) 和 pRa7653Rb (260 Md) 上(图 1 孔 1);7653R 的突变菌株 7653R1 仍携带有部分 *nod* 基因序列(图 1 孔 2)。S52 的 *nod* 基因仅存在于小质粒 pRa52a(120Md)上,故它的突变株 S52-S2 消除了大质粒后仍保持结瘤功能(图 1 孔 3 和孔 4)。SR72 及 HR104 的 *nod* 基因序列也分别存在于较小质粒 pRa72a (120Md)、pRa104a (110 Md) 上(图 1 孔 5 和孔 6)。

孔 7 为菜豆根瘤菌 3622-15, 强显影

带是由于 RP4-4 与 pRmSL42 的克隆载体 pBR 325 带有共同的 Tc^r 基因片段, RP 4-4 分子量小故转移效率也高。共生质粒 pRph3622b (260Md) 有一显影带,表明杂交结果可靠。此外, pRph3622a (120Md) 亦有杂交反应。

孔 8 为快生型大豆根瘤菌 USDA205, 其 *nod* 基因序列同时存在于质粒 pRja205c 和 pRja205d (125Md, 230Md) 上。

图 1 点样孔的显影是由残留在孔中的菌体 DNA 与 *nod* 基因探针杂交的结果, 其意义相当于菌落原位杂交。

此外, 用 ^{32}P 标记的 pBR 325 与以上各菌株的质粒在相同条件下进行杂交, 除 3622-15 的质粒 RP4-4 外, 其它质粒均无

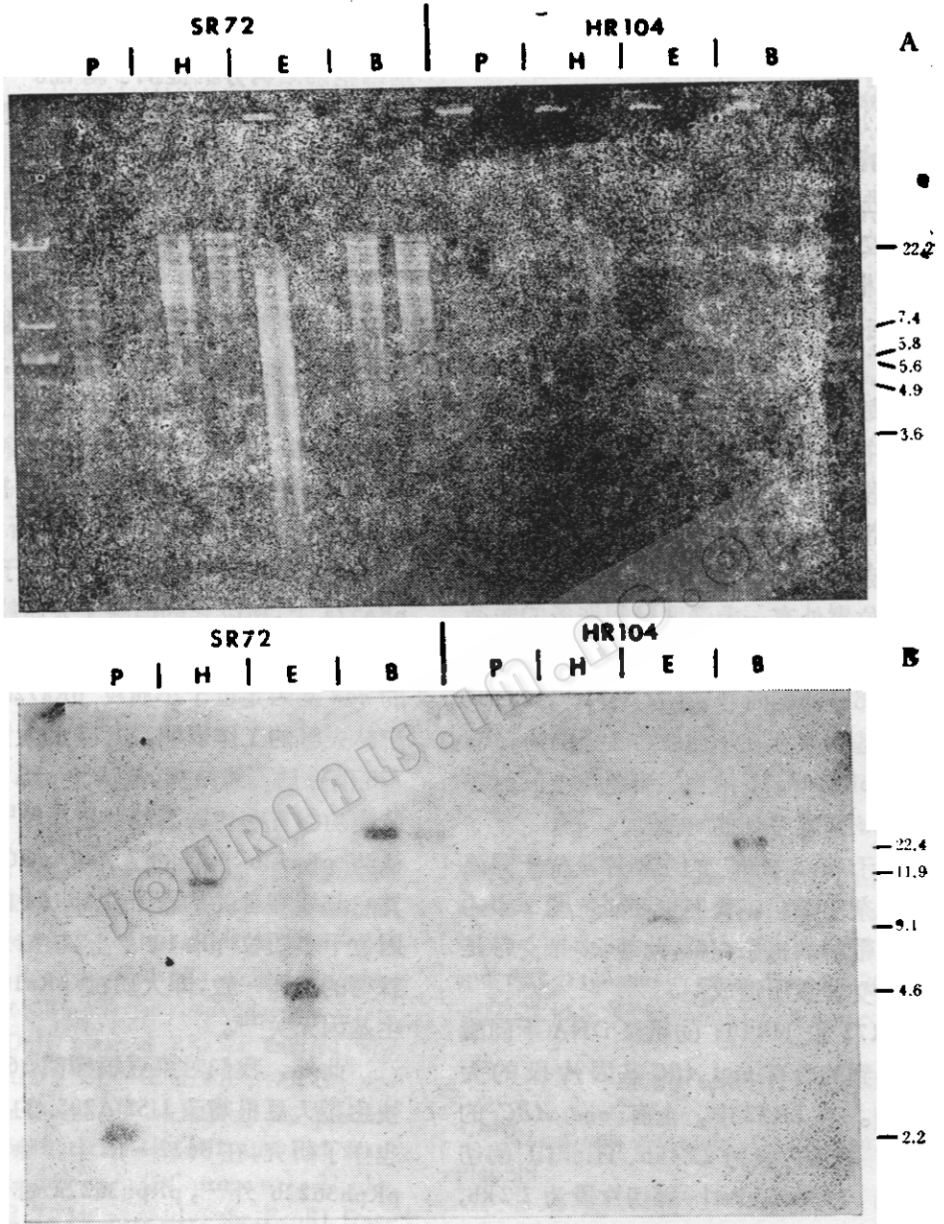


图 2 紫云英根瘤菌 SR72,HR104 质粒 DNA/总 DNA 的不同酶切片段与 ³²P-pRmSL42 的杂交
 A 为酶切片段的电泳图谱, 标准分子量对照为 λDNA-EcoRI (单位 kb), B 为放射自显影结果。
 内切酶缩写: P 为 PstI;H 为 HindIII; E 为 EcoRI; B 为 BamHI。在每种酶切处理中, 左边的孔为质粒 DNA, 右边的孔为总 DNA。

Fig. 2 Hybridization of ³²P-pRmSL42 to Southern blots of restriction enzyme digests of plasmid DNA/total DNA from *R. astragali* strains SR72 and HR104
 (A) Digest pattern of plasmid DNA/total DNA, the molecular standard is λ DNA-EcoRI fragments (kb); (B) Hybridization patterns. The abbreviations of restriction enzymes used: P, PstI; H, HindIII; E, EcoRI; B, BamHI. In each digest treatment, the left is the digest of plasmid DNA, the right is the digest of total DNA.

阳性杂交反应,排除了 pRmSL42 的克隆载体 pBR325 与所研究菌株的质粒有同源序列的可能。

(二) 紫云英根瘤菌质粒 DNA/总 DNA 的酶切片段与 *nod* 基因探针的杂交

为进一步研究紫云英根瘤菌的 *nod* 基因在质粒及染色体中的分布情况,我们对紫云英根瘤菌 SR72 和 HR104 的质粒 DNA 与总 DNA 进行了酶切比较研究(图 2)。

在每组质粒 DNA/总 DNA 的对照酶切处理中,除 HR104 的质粒 DNA-HindIII 酶切片段由于 DNA 量太少而无足够强度的杂交带外,每组的质粒 DNA 酶切都有一条强杂交带,而同组的总 DNA 酶切仅在相应位置处有一条强度减弱许多的弱杂交带。这是因为质粒 DNA 仅占总 DNA 的一小部分。同时也表明,SR72 和 HR104 的 *nod* 基因仅存在于质粒中(分别为 pRa 72a 和 pRa104a),排除了染色体上同时存在有 *nod* 基因序列的可能。

由于 *nod ABC* 的主要片段位于同源性强的杂交带中,我们主要研究图 2 中的强杂交带和次强杂交带,此外,弱杂交带是由于杂交背景所造成。

SR72 和 HR104 的质粒 DNA 不同酶切所得到的含有 *nod ABC* 基因片段的大小不同。在 SR72 中,含有 *nod ABC* 的 BamHI 酶切片段为 22.4kb、HindIII 酶切片段为 11.9kb、PstI 酶切片段为 2.2 kb, EcoRI 酶切有两条杂交带,一条为强杂交带 4.6kb、一条为次强杂交带 3.0kb,表明 SR72 的 *nod ABC* 基因序列中有 EcoRI 酶切位点。在 HR104 中,含有 *nod ABC* 的 BamHI 酶切片段为 22.4kb、EcoRI 酶切片段为 9.1kb、PstI 酶切片段为 2.2kb。值得注意的是,SR72 和 HR104 的 *nod ABC* 基因位于相同大小的 BamHI 酶切片段(22.4

kb)及 PstI 酶切片段(2.2kb)上。

以上研究为 SR72 和 HR104 的 *nod* 基因精细结构分析提供了基础。将来把 SR72 和 HR104 含 *nod ABC* 基因的 22.4 kb BamHI 片段进行克隆,可望得到较完整的 *nod ABC* 基因及其相关基因片段。

讨 论

紫云英根瘤菌同大多数快生型根瘤菌一样,*nod* 基因位于质粒上。其中,7653R 的 *nod* 基因同时存在于两个质粒上(pRa 7653Ra 和 pRa 7653 Rb),但消除了 pRa 7653Rb 的突变株 7653R1 不能结瘤,表明 pRa7653Ra 上并没有结瘤功能所需的全部基因。S52 的 *nod* 基因仅存在于小质粒 pRa52a 上,所以它的消除了大质粒的突变株 S52-S2 仍能结瘤(Nod⁺Fix⁻)。SR72 的 *nod* 基因定位于小质粒 pRa72a 上。但宁林夫等的工作表明,SR72 的大质粒 pRa 72b 消除后不能结瘤,故认为 pRa 72b 是与结瘤功能有密切联系的共生质粒^[1]。我们认为 pRa72b 含有的是 *nod ABC* 以外的其它与结瘤有关的因子。HR104 的 *nod* 基因位于小质粒 pRa104a 上,该结果与王常霖等的工作一致,即大质粒 pRa104c 与共生基因无关^[1]。

此外,我们对菜豆根瘤菌 3622-15 和快生型大豆根瘤菌 USDA205 的 *nod* 基因也作了研究,在 3622-15 中,除共生质粒 pRph3622b 外^[12],pRph3622a 亦含有部分 *nod ABC* 基因。在 USDA205 中,Masterson 等的工作表明它的 *nod* 基因位于分子量为 200 Md 左右的质粒(即 pRja 205d)上^[6];而宁林夫等将 USDA205 的质粒 pRja205c 消除后,得到 Nod⁻突变株 USDA 205HC^[13]。我们的工作证实,USDA205 的结瘤功能与两个质粒 pRja205c 和 pRja 205d 都有关,它们均含有部分或全部 *nod*

ABC 基因片段。

参 考 文 献

- [1] 宁林夫等: 遗传学报, **13**(1): 1—10, 1986。
 [2] 李仲贤等: 华中农学院学报, **2**(1): 1—9, 1983。
 [3] 周俊初等: 华中农业大学学报, **6**(2), 156—164, 1987。
 [4] Banfalvi, Z. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **184**: 318—325, 1981。
 [5] Hombrecher, G. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **182**: 133—135, 1981。
 [6] Masterson, R. V. et al.: *J. Bacteriol.*, **163**: 21—26, 1985。
 [7] Pankhurst, C. E. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 2535—2543, 1983。
 [8] Fisher, R. W. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1432—1435, 1985。
 [9] Kondorosi, E. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **193**: 445—452, 1984。
 [10] Spaink, H. P. et al.: *Nature*, **328**: 337—340, 1987。
 [11] 王常霖等: 华中农业大学学报, **7**(1): 15—21, 1988。
 [12] 王常霖等: 遗传学报, **15**(1): 25—33, 1988。
 [13] 宁林夫等: 微生物学报, **26**(3): 271—276, 1986。
 [14] Egelhoff, T. T. et al.: *DNA*, **4**: 241—248, 1985。
 [15] 张忠明等: 华中农业大学学报, **5**(4), 326—331, 1986。

THE LOCATION OF NODULATION GENES IN *RHIZOBIUM ASTRAGALI*

Wei Hui

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Li Fudi

(Huazhong Agricultural University, Wuhan)

Based on the conservation of *nod ABC* genes in *Rhizobium*, authors located the nodulation genes on the plasmids of *Rhizobium astragali*. Both plasmid pRa7653Ra and plasmid pRa7653Rb carried *nod* genes in strain 7653R. Only plasmid pRa52a carried *nod* genes in strain S52. In strain SR72, the *nod* genes were harbored exclusively on plasmid pRa72a, the BamHI, HindIII and PstI fragments contained *nod ABC* genes were 22.4 kb, 11.9 kb and 2.2 kb respectively; the EcoRI frag-

ments were 4.6 kb and 3.0 kb. In strain HR104, the *nod* genes were harbored exclusively on plasmid pRa104a, the BamHI, EcoRI and PstI fragments contained *nod ABC* genes were 22.4 kb, 9.1 kb and 2.2 kb respectively.

Key words

Rhizobium astragali; Nodulation genes;
Plasmid