

紫云英根瘤菌 Ra159 的巨大质粒上 存在有 nod 和 nif 基因的证明*

金润之 朱劲松 江群益 沈思师 沈善炯

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

在紫云英根瘤菌 (*Rhizobium astragali*) Ra159 中存在有两个分子量分别约为 300Md(pRa159a) 及大于 300Md(pRa159b) 的巨大质粒。以肺炎克氏杆菌的固氮酶结构基因 nif HDK 片段和苜蓿根瘤菌共同结瘤基因 nod ABCD 片段作探针进行的杂交试验证明了紫云英根瘤菌的大质粒 pRa159b 上存在有 nod 基因和 nif 基因。将这些大质粒转移到 nod-nif 基因缺失的苜蓿根瘤菌突变株 Rm627-1, 只有带 pRa159b 的转移接合子能在紫云英植物上形成根瘤, 但这些根瘤均不能还原乙炔。

关键词 紫云英根瘤菌; 大质粒; nod-nif 基因

根瘤菌是一类革兰氏阴性土壤微生物, 它专一地在豆科植物根部诱导形成能固氮的根瘤。遗传和生化的证据表明苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*)、豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*)、菜豆根瘤菌 (*R. phaceoli*)、三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*) 等快生型根瘤菌的结瘤和固氮所必需的基因位于大质粒上。这些携带共生基因的大质粒称共生质粒 pSym^[1,2]。在不同的根瘤菌中, 这些共生质粒的大小和数目各不相同。例如一株菜豆根瘤菌 (*R. phaceoli* CFN 499) 有大小分别为 185、225 和 410kb 的质粒, 但仅 410kb 大小的质粒携带有结瘤和固氮所必需的基因^[3]。在苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti* 2011) 中共生基因位于二个大小分别为 1200kb 和 1500kb 的巨大质粒上^[2]。在不同的三叶草根瘤菌株中其共生质粒数从 1—3 个各不相同, 质粒的大小从 111—418kb 不等^[4]。近几年也已报道紫云英根瘤菌 (*R. astragali*) 中与结瘤功能有关的 nod 基因位于分子量为 110—260Md 大小不等的质粒上^[5,6]。一些研究表明, 共生质粒可以转移到不同种的根瘤菌或根癌农杆菌。共生质粒在根瘤菌种间的转移导致多种结果, 可使接合子在新的宿主植物上结瘤固氮^[7], 或者仅能在新的宿主植物上形成根瘤而不固氮^[8], 也有的甚而不能在新的宿主植物上诱导形成根瘤^[9]。

本文介绍我们实验室用琼脂糖凝胶中溶菌及电场倒转技术检测紫云英根瘤菌 Ra159 中有二个内源质粒。证实紫云英根瘤菌 Ra159 的一个大质粒 pRa159b 上存在有 nod 基因和 nif HDK 基因, 并进行了将紫云英根瘤菌大质粒接合转移到苜蓿根瘤菌的试验。

材 料 和 方 法

(一) 菌株、质粒和培养条件

本文于 1991 年 10 月 22 日收到。

* 国家重点科技攻关基金资助项目。

菌株和质粒见表 1。

根瘤菌生长于 TY 培养基 (28 °C); 大肠杆菌生长于 LB 培养基 (37 °C)。固体培养基加 1.5% 琼脂, 抗菌素在培养基中最终浓度: 链霉素 (Sm) 500 µg/ml; 新霉素 (Nm) 100 µg/ml; 利福霉素 (Rif) 100 µg/ml。

(二) 质粒检测和质粒 DNA 的制备

大质粒的检测采用琼脂糖凝胶中溶菌^[10]及电场倒转电泳技术^[11]进行。

大质粒 DNA 的制备按 Rossenberg^[10]方法, 经 CsCl 密度梯度超离心纯化。

表 1 细菌菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株与质粒 Strain & plasmid	有关性状 Relevant characters	参 考 Reference
<i>E. coli</i>		
S17-1	294 recA, chromosomally integrated RP4 derivative; Tp ^r	[14]
SM10	thi, thr, leu	[14]
<i>R. astragali</i> 159	wild type; Sm ^r	this Lab.
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Sm ^s	[15]
<i>R. meliloti</i>	Nod ⁻ derivatives of wild type <i>R. meliloti</i> obtained by heat-treatment	[16]
AK627		
AK627-1	Rif mutant from AK627	this work
plasmids:		
pSUP 5011	km ^r , Cm ^r	[14]
RP4-4	Ap ^r , Tc ^r	[14]
pRmSL42	Ap ^r	[17]
pSA30	Tc ^r	[18]

(三) 限制性内切酶

所使用的限制性内切酶均购自 Biolabs, 反应按 Biolabs 所示条件进行。

(四) DNA 印迹法转移及滤膜杂交

Southern 转移、缺口翻译、DNA 杂交按 Maniatis^[12] 等方法进行。大质粒 DNA 转移前用紫外光照 20 分钟, 0.25mol/L HCl 处理 2 次, 每次 10 分钟。

探针 DNA 用 α -³²PdATP 标记。DNA 探针的比放射性强度为 7×10^7 cpm/µg。

DNA 杂交在 5×SSC, 5×Denhardt's, 0.5% SDS 溶液中进行。放射性自显影用上海感光胶片厂生产的 X 光片, 在 -70 °C 放射自显影 3—10 天。

(五) 接合转移试验

按 Simon^[13] 等方法进行。

(六) 植物结瘤试验及乙炔还原分析

紫云英种子、苜蓿种子在 0.1% HgCl₂ 中消毒处理, 充分漂洗后在无菌平皿中发芽, 然后将幼苗移种于 Jensen—琼脂斜面上, 接种根瘤菌培养液, 置于光照培养箱, 昼/夜温度

为 24 ℃ /16 ℃, 日光照 15 小时生长 30 天后测定根瘤的乙炔还原能力。

结 果

(一) 紫云英根瘤菌 Ra159 内源质粒的检测

一些报道指出, 自采取较温和的分离质粒 DNA 的方法后才在根瘤菌中检测到高分子量 (大于 300Md) 的巨大质粒存在。我们采用的琼脂糖凝胶中溶菌及电场倒转电泳技术是非常温和的分离质粒 DNA 的方法。图 1 为采用此法分离紫云英根瘤菌质粒 DNA 的电泳图谱。可以检测到紫云英根瘤菌 Ra159 有二条质粒 DNA 带。将这两条质粒 DNA 带的电泳迁移率与 *Rhizobium* sp. NGR234 中的质粒 DNA 带 (分子量为 $310 \pm 20\text{Md}$)^[15] 的电泳迁移率相比较, 可以看出紫云英根瘤菌 Ra159 中电泳迁移较快的质粒 DNA 带 pRa159a 分子量为 300Md(460kb) 左右, 另一条质粒 DNA 带 pRa159b 分子量明显地大于 300Md。

(二) 紫云英根瘤菌 Ra159 的大质粒 pRa159b 上携带有 nod 基因和 nif 基因

基于固氮微生物中的固氮酶结构基因 nif HDK 以及根瘤菌中共同结瘤基因 nod ABCD 结构的高度保守性, 因此可依据同源杂交来确定紫云英根瘤菌的 nif 基因和 nod 基因是否位于质粒上。将电泳分离的两条质粒 DNA 带转移到硝酸纤维滤膜上, 分别用 ^{32}P 标记的 2.2kb Rmnod ABCD 片段 (来于质粒 pRmSL42 的 Bam HI-Hind III 酶解物) 及 ^{32}P 标记的 6.2kb Kp nif HDK 片段 (来于质粒 pSA30 的 EcoRI 酶解物) 作探针进行杂交。同时以 *Rhizobium* sp. NGR234 的质粒 DNA 作对照。已知该质粒上携带了为结瘤和固氮所必需的基因。放射性自显影结果表明 (见图 2) 探针 DNA Rm nod ABCD 片段及 Kp nif HDK 片段能与其中分子量较大的质粒 pRa159b 进行杂交而不与分子量较小的质粒 pRa159a 杂交。表明了 pRa159b 上携带有 nod 基因和 nif 基因。

我们也通过 CsCl 密度梯度超离心分离和纯化得到紫云英根瘤菌 Ra159 质粒 DNA 带 (ccc DNA)。经 EcoRI 酶解, 琼脂糖凝胶电泳, DNA 转移至硝酸纤维素滤膜上, 同样分别以 ^{32}P 标记的 2.2kb Rm nod ABCD 片段及 ^{32}P 标记的 6.2kb Kp nif HDK 片段为探针进行滤膜杂交。结果 (见图 3) 表明质粒 DNA EcoRI 酶解物有三个片段 (18.5kb, 8.3kb, 2.2kb) 能与探针 DNA Rm nod ABCD 片段杂交。有五个片段 (20.5kb, 9.3kb, 8.0kb, 5.2kb, 4.7kb) 能与探针 DNA Kp nif HDK 片段杂交。这一结果同样证实紫云英根瘤菌 Ra159 的大质粒

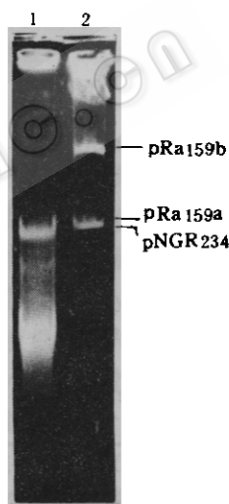


图 1 紫云英根瘤菌 Ra159 中大质粒的检测

1. *Rhizobium* sp. NGR234 (含一个大质粒 $310 \pm 20\text{Md}$); 2. *R. astragali* 159

Fig. 1 Detection of large plasmids in *R. astragali* 159

Lane 1. *Rhizobium* sp. NGR234 (contain a plasmid band $310 \pm 20\text{Md}$);

Lane 2. *R. astragali* 159

上携带有 nod 基因和 nif 基因。

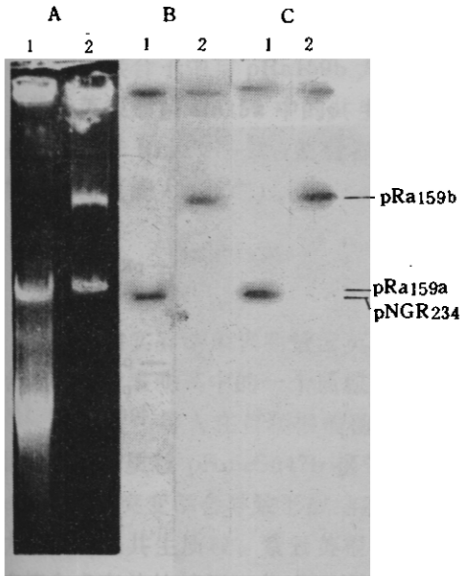


图 2 紫云英根瘤菌质粒与 nod 探针和 nif 探针的杂交

- 质粒电泳图谱;
- 质粒与 ^{32}P 标记的 Rm nod ABCD 片段杂交的放射自显影;
- 质粒与 ^{32}P 标记的 Kp nif HDK 片段杂交的放射自显影。

- Rhizobium* sp. NGR234;
- R. astragali* 159

Fig. 2 Hybridization of nod and nif probes to *R. astragali* plasmids

- Agarose gel electrophoresis of plasmids;
- Hybridization of ^{32}P -labeled Rm nod ABCD fragments to plasmids;
- Hybridization of ^{32}P -labeled Kp nif HDK fragments to plasmids.

- Lane 1. *Rhizobium* sp. NGR234;
- Lane 2. *R. astragali* 159

(三) 紫云英根瘤菌大质粒向苜蓿根瘤菌的转移

按 Simon 等方法将带有转座子 Tn5-mob 的自杀质粒 pSUP5011 经接合转移至紫云英根瘤菌 Ra159(Sm^r), 转座子 Tn5-mob 随机插入 Ra159 的染色体或质粒上。经选择纯化得到 200 株带新霉素抗性 (Nm^r) 的 Ra159。在质粒 Rp4-4 的帮助下, 通过接合转移使 Ra159 中带 Tn5 标记的大质粒进入到结瘤基因和固氮基因都缺失的苜蓿根瘤菌突变株 Rm627-1(Rif^r)。在补充 Sm Nm Rif 的 TY 培养基上选择得到的苜蓿根瘤菌接合子中即包含了 Ra159 的大质粒。共选择到 26 株接合子, 接合转移频率为 10^{-7} /受体细胞。

将接合子分别接种紫云英幼苗及苜蓿幼苗, 置光照培养箱观察一月, 在接种的 26 株接

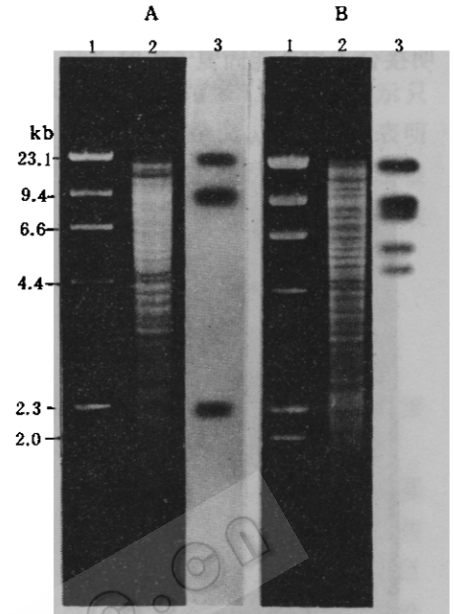


图 3 紫云英根瘤菌质粒 DNA 的 EcoRI 酶解物与 nod(A) 和 nif(B) 探针的杂交

- 标准分子量对照 $\lambda\text{DNA-Hind III}$ (kb);
- 质粒 DNA 的 EcoRI 酶解物的电泳图谱;
- 放射自显影结果

Fig. 3 Hybridization of nod (A) and nif (B) probes to EcoRI digested plasmid DNA from *R. astragali* 159

- Lane 1. The molecular standard is DNA-HindIII fragments(kb);
- Lane 2. Agarose gel electrophoresis of EcoRI digested plasmid DNA;
- Lane 3. Hybridization pattern

合子中有 18 株能在紫云英根部结瘤。并从根瘤中分离到性状为 $Nod^+Sm^rNm^rRif^r$ 的苜蓿根瘤菌。同时以接种苜蓿幼苗作对照, 结果均无根瘤出现。对根瘤进行的乙炔还原分析表明接合子均不能固氮 (表 2)。

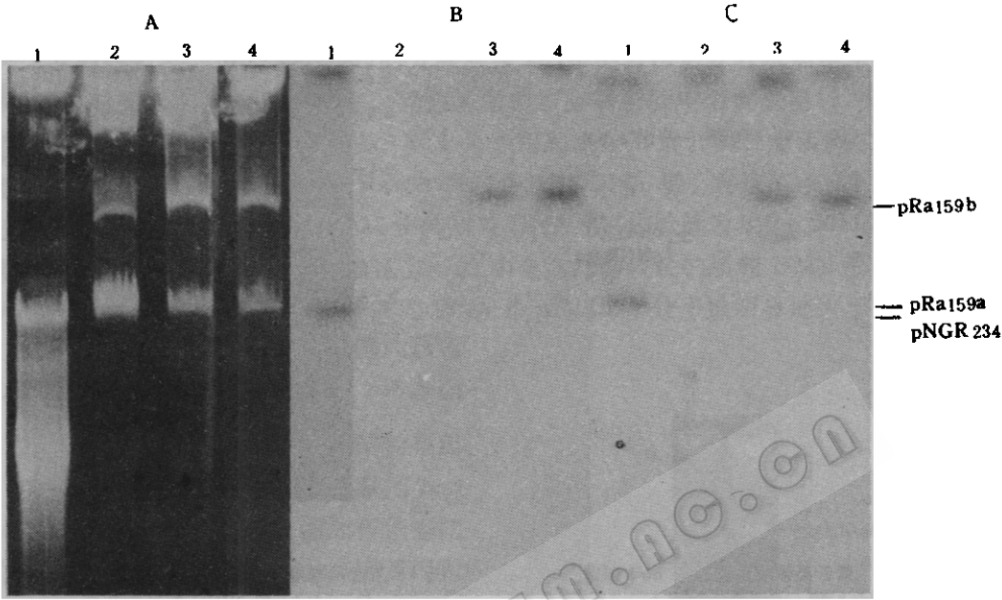


图 4 转移接合子质粒与 *nod*、*nif* 探针的杂交
A. 质粒电泳图谱; B. 与 ^{32}P 标记的 *Rm nod ABCD* 片段杂交;
C. 与 ^{32}P 标记的 *Kp nif HDK* 片段杂交。
1. *Rhizobium* sp. NGR234; 2. *Rm AK 627-1*;
3. *Rm AK 627-1* (pRa159b); 4. *R. astragali* 159
Fig. 4 Hybridization of *nod* and *nif* probs to plasmids from transconjugants
A. Agarose gel electrophoresis of plasmids;
B. Hybridization of ^{32}P -labeled *Rm nod ABCD* fragments to plasmids;
C. Hybridization of ^{32}P -labeled *Kp nif HDK* fragments to plasmids.
Lane 1. *Rhizobium* sp. NGR234; Lane 2. *Rm AK627-1*;
Lane 3. *Rm AK627-1* (pRa 159b); Lane 4. *R. astragali* 159

表 2 转移接合子在紫云英和苜蓿植物上的结瘤固氮特性
Table 2 Nodulation and nitrogen fixation in *Astragalus sinica* and *alfalfa* of transconjugants

菌株 Strain	紫云英 <i>Astragalus sinica</i>		苜 蓿 <i>Alfalfa</i>	
	<i>nod</i>	<i>nif</i>	<i>nod</i>	<i>nif</i>
Ra 159	+	+	-	-
Rm 1021	-	-	+	+
Rm AK627-1	-	-	-	-
Rm AK627-1 (pRa159b)	+	-	-	-

在 26 株接合子中各取三株表型分别为 Nod^+ 及 Nod^- 的接合子进行分析 (如图 4 所

示), 表型为 Nod^+ 的接合子增加了一条大小与 pRa159b 相同的质粒 DNA 带, 而表型为 Nod^- 的接合子均无这条质粒 DNA 带。同时分别用 ^{32}P 标记的 Rm nod ABCD 片段及 ^{32}P 标记的 Kp nif HDK 片段作探针与接合子质粒 DNA 进行杂交, 结果 (见图 4) 显示只有 Nod^+ 接合子中与 pRa159b 大小相同的质粒 DNA 能与探针 DNA 杂交。上述结果表明了紫云英根瘤菌 Ra159 中的共生质粒 pRa159b 转入进结瘤基因和固氮基因缺失的苜蓿根瘤菌突变株 Rm 627-1 后使后者获得了在紫云英植物上结瘤的能力。但这些根瘤均为无效根瘤无固氮能力 (Fix^-)。

讨 论

我们的实验结果表明紫云英根瘤菌 Ra159 中存在两个内源大质粒。分子杂交试验及接合转移试验表明其中的一个质粒 pRa159b 是携带 nod-nif 基因的共生质粒。

Finan^[19] 等人在苜蓿根瘤菌 Su47 的研究中指出质粒 pRmeSu47a 携带有 nod-nif 基因, 而另一质粒 pRmeSu47b 携带有与胞外多糖有关的 exo A、B、E、F 基因。这些 exo 基因的突变都会导致形成结瘤不固氮的无效根瘤 (Fix^-), 因此在菌株 Su47 中的两个巨大质粒都是共生质粒。紫云英根瘤菌 Ra159 中的另一个质粒 pRa159a 上是否带有与胞外多糖合成有关的基因尚待进一步实验证明, 因此目前尚不能排除质粒 pRa159a 也是共生质粒的可能性。

有报道指出豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌和菜豆根瘤菌三者种间共生质粒的转移可以使接合子获得在各自新的宿主植物上结瘤固氮的能力^[7,20]。我们得到的包含紫云英根瘤菌大质粒 pRa159b 的苜蓿根瘤菌接合子 Rm627-1(pRa159b) 能在紫云英植物上结瘤, 但均不固氮 (Fix^-)。一种可能性是由于在紫云英根瘤菌中的另一质粒 pRa159a 上携带有与共生固氮有关的一些基因例 exo 基因等, 而我们选择的接合子仅含 pRa159b, 因此导致在紫云英植物上结瘤而不固氮; 另一种可能是一些对共生固氮有关的基因位于 Ra159 的染色体上。在苜蓿根瘤菌中已经发现 exoC、exoD 以及几个 fix 基因位于染色体上。这些基因与根瘤发育的晚期或固氮过程有关^[19,20]。豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌和菜豆根瘤菌的染色体 DNA 是高度同源的^[21], 因此它们之间共生质粒的转移, 其接合子能在新的宿主植物上形成有效根瘤 (Fix^+)。而紫云英根瘤菌和苜蓿根瘤菌的染色体 DNA 之间的同源性研究目前未见有报道, RmAK627-1(pRa159b) 接合子可能由于缺少一些在紫云英植物上共生固氮所必需的基因而导致 Fix^- 表型。

参 考 文 献

- [1] Prakash, et al.: *Int. Rev. Cytol.*, **104**:1-24, 1986.
- [2] Burkhardt, B. et al.: *Plasmid*, **17**:13-25, 1987.
- [3] Martinez, E. et al.: *J. Bacteriol.*, **169**:2828-2834, 1987.
- [4] Harrison, S. P. et al.: *J. Gen. Microbil.*, **134**:2721-2730, 1988.
- [5] 宁林夫等: 遗传学报, **13**(1):1-10, 1986.
- [6] 魏 辉等: 微生物学报, **30**(5):330-335, 1990.
- [7] Hooykaas, P. J. J. et al.: *Nature*, **291**:351-353, 1981.
- [8] Hooykaas, P. J. J. et al.: *Plasmid*, **8**:73-82, 1982.
- [9] Djordjevic, M. A.: *J. Bacteriol.*, **156**:1035-1045, 1983.
- [10] Rossenberg, C. et al.: *J. Bacteriol.*, **150**:402-406, 1982.
- [11] Carle, G. F. et al.: *Science*, **234**:1582, 1986.

- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [13] Simon, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **196**:413—420, 1984.
- [14] Simon, R. et al.: *Biotechnology*, **1**:784—791, 1983.
- [15] Pankhurst, C. E. et al.: *Molecular Genetics of the Bacteriol-Plant Interaction*, p.169—176 (ed. A., Publer), 1983.
- [16] Kondorosi, E. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **193**:445—452, 1984.
- [17] Egelhoff, T. T. et al.: *DNA*, **4**:241—248, 1985.
- [18] Cannon, F. C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **174**:59—66, 1979.
- [19] Finan, T. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **167**:66—72, 1986.
- [20] Johnston, A. W. B. et al.: *Nature*, **276**:635—636, 1978.
- [21] Kondorosi, A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **188**:433—439, 1982.

EVIDENCE OF NOD AND NIF GENES ON MEGAPLASMID IN *RHIZOBIUM ASTRAGALI* 159

Jin Runzhi Zhu Jinsong Jiang Qunyi Shen Sishi Shen Sanchiun
(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

R. astragali strain 159 was shown to harbour two indigenous plasmids with molecular weights of 300 Md (pRa 159a) and more than 300 Md (pRa 159b).

Hybridization experiments with ^{32}P -labeled Rm nod ABCD fragments and ^{32}P -labeled Kp nif HDK fragments demonstrated the presence of these genes on the megaplasmid (pRa 159b).

We transferred these plasmids to a nod-nif region deletion mutant strain *R. meliloti* AK627-1. Only transconjugants harboring pRa 159b nodulated *Astragalus sinica*. Nodules formed by this transconjugants were unable to reduce acetylene.

Key words *Rhizobium astragali*; Megaplasmid; nod-nif genes