

固氮粪产碱菌 *ntrC-lacZ* 融合基因的构建及其在水稻根部的表达*

程红梅¹ 林敏¹ 平淑珍¹ Elmerich C³ 贾士荣²

(¹中国农业科学院原子能利用研究所 北京 100094)

(²中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)

(³法国巴斯德研究所 巴黎)

摘要 将粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) A1501 *ntrC* 基因和 *lacZ* 基因正向克隆于广泛性转移载体 pLA2917 上, 获得多拷贝 *ntrC* 质粒 pLAC1 和含 *ntrC-lacZ* 融合基因的重组质粒 pLAC2. 采用双亲结合方法, 将上述两个重组质粒导入 A1501 中, 获得含 *ntrC-lacZ* 融合基因的结合子 A15C2 和 *ntrC* 多拷贝结合子 A15C1. 采用 X-gal 原位显色技术、显微切片、扫描电镜观察及 *ntrC* 部分缺失突变株研究粪产碱菌 *ntrC* 在根部的表达及功能, 结果表明粪产碱菌 A1501 在水稻根部有较强的定殖能力, 并能进入水稻根内定殖. 在水稻主侧根伸长区及根内皮层薄壁细胞及侧根分生区 *ntrC-lacZ* 融合基因表达活性明显高于别的部位. 高铵条件下多拷贝 *ntrC* 结合子根表定殖能力大于野生型, 而 *ntrC* 突变株则低于野生型. 表明 *ntrC* 基因参与固氮菌根表结合的过程.

关键词 粪产碱菌, *ntrC-lacZ* 融合基因, *ntrC* 突变株, 表达调控, 多拷贝 *ntrC* 结合子

分类号 Q78

联合固氮菌在根表定殖及其固氮基因在根部表达机制是联合固氮研究的两个基本理论问题, 其过程涉及一系列细菌基因如胞外多糖合成酶基因或固氮基因等的表达与调节^[1~4]. 联合固氮菌能在宿主植物根表粘附、定位和定殖, 但不能形成类似根瘤的可见结构, 与宿主植物之间建立的是一种松散的共生关系^[5], 目前对于联合固氮体系建立的分子基础仍缺乏直接的分子生物学特别是分子遗传学证据. 本文在构建粪产碱菌 *ntrC-lacZ* 融合基因的基础上, 采用多拷贝 *ntrC* 结合子和 *ntrC* 部分缺失突变株, 研究 *ntrC* 基因在水稻根部的表达及其在根表定殖过程中所起的作用.

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和材料

本实验所采用的菌种和质粒列于表 1.

水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种: 秀水 04 (由浙江省嘉兴市农科所提供).

*国家高科技发展 (863) 计划和 China-France Advance Research Programme 资助课题.

收稿日期: 1997-06-24

表1 供试菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株与质粒	基因型或表现型	来源或文献
Strains and plasmids	Genotype or phenotype	Source or reference
菌株 Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
S17.1	高频转染菌株	本室保存
<i>A. faecalis</i>		
A1501	野生型	[9]
A15CM1	<i>ntrC</i> 部分缺失突变株, Km ^r	另文报道
A15C1	<i>ntrC</i> 多拷贝结合子, Km ^r	本工作
A15C2	<i>ntrC-lacZ</i> 结合子, Km ^r	本工作
质粒 Plasmids:		
pLA2917	广泛宿主范围的可转移载体, Km ^r 和Tc ^r	[10]
pBLC9	粪产碱菌6.5kb XhoI <i>ntrC</i> 基因的亚克隆	[11]
pLAC1	Km ^r , pLA2917中含6.5kb XhoI粪产碱菌 <i>ntrC</i> 基因片段	本工作
pLAC2	Km ^r , pLAC1含4.7kb <i>lacZ</i> 片段, 正向	本工作
pKOK5	Km ^r , 含 <i>lacZ</i> 片段	本室保存

1.2 培养基

LB培养基、水稻培养基、粪产碱菌 A1501 限制性培养基按林敏方法^[6]。

1.3 试剂和酶

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司和华美公司。

1.4 DNA 操作

质粒 DNA 提取, 限制性内切酶酶切、DNA 片段回收、DNA 连接与细菌转化等均按“分子克隆实验指南”所述操作^[7]

1.5 结合试验

按 Franche 等的方法^[8]。

1.6 水稻的接种

1.6.1 水稻发芽: 70% 酒精浸泡 2 min, 无菌水冲洗 2 次, 0.1% 升汞浸泡 1 h, 然后用无菌水冲洗 3~5 次, 30℃ 保温发芽 3~4 d。移入光照培养箱中生长 (30℃, 光强 16000~18000 lux, 16 h 光照 / 8 h 黑暗)。

1.6.2 接种: 将萌发成苗的水稻转移二叶期到水稻液体培养基培养 5 d, 取 A15C1、A15C2 和 A15CM1 的过夜培养物离心沉淀后用水稻培养基洗 2 次, 分别再接种在水稻培养基中, 摇匀, 每个处理 5 次重复, 培养 5 d。

1.7 根部的表达

1.7.1 水稻根的染色: 将接种 A15C2 的水稻根在含 0.88% NaCl 的 0.1 mol / L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中洗涤三次, 除去根表的杂质。加入 4 ml 缓冲液 Z (0.06 mol / L Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.04 mol / L NaH₂PO₄ · 7H₂O, 0.01 mol / L KCl, 0.001 mol / L MgSO₄ · 7H₂O, 用时加 0.05 mol / L β-巯基乙醇, pH 调至 7.0)、40 μl 三氯甲烷、80 μl 0.1% SDS, 室温下

1 h, 用缓冲液冲洗 3 次, 每次 15 min, 然后加入 0.33mg / ml $K_3Fe(CN)_6$ 和 0.42 mg / ml $K_4Fe(CN)_6$ 及 0.5 mg / ml X-gal [5-bromo-4-chloro-3-indolyl-(D-galactopyranoside)] 的磷酸缓冲液, 室温保温 24 h.

1.7.2 石蜡切片及显微照相: 根表显微照相后, 将根切成 1~2 cm 小段, FAA 固定液固定, 逐级酒精脱水, 石蜡包埋, 切片、厚度为 10 μ m, 二甲苯脱蜡, 封片、显微观察和照相.

1.8 根表计数和扫描电镜

将接种 A15C1 和 A15CM1 的水稻根在含 0.88% NaCl 的磷酸盐缓冲液中洗涤数次, 除去根表的杂质, 取其中一个处理根样进行饿酸蒸气法固定, 用日立 HUS-5GB 真空喷涂仪喷金, 日立 S450 扫描电镜进行电镜观察, 另外 4 个重复称鲜重、研磨、梯度稀释, 涂在 A15 限制性培养基上, 培养 24 h 后计单菌落数, 取平均数.

2 结果和讨论

2.1 粪产碱菌 *ntnC* 转移载体的构建

在广泛宿主范围的高效率转移载体 pLA2917 载体中 SalI 为单一酶切位点, 利用同裂酶特点将含功能完整的 *ntnC* 的 6.5 kb XhoI 片段插入到 pLA2917 的 SalI 位点上, 由于该位点的插入使重组质粒丧失 Tc 抗性, 筛选具 Km 抗性的重组克隆 pLAC1, 并根据不同酶切鉴定, 确定插入方向 (图 1) 含完整功能的 *ntnC* 转移载体物理图谱如图 2.



图 1 pLAC1 限制性内切酶分析

Fig.1 Restriction digestion analysis of pLAC1

A: λ DNA/HindIII; B: pBLC9/XhoI 6.5, 3.5, 1.2kb; C: pLAC1/SalI 24.2, 2.3, 1.0kb; D: pLAC1/KpnI+HindIII 23.2, 4.3kb; E: pLA2917/SalI+HindIII 17.7, 3.3kb; F: pLA2917/SalI 21kb; G: pLAC1/BamHI 27.7kb.

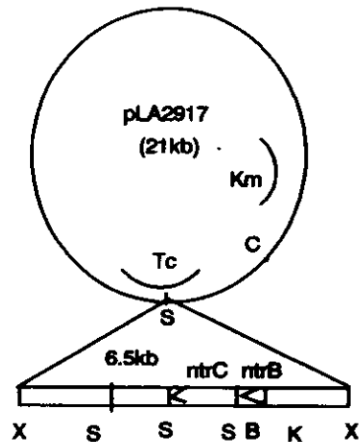


图 2 pLAC1 的物理图谱

C: Cos 位点; Km: 卡那霉素抗性基因; Tc: 四环素抗性基因; <: 表示插入方向.

Fig.2 Physical map of pLAC1

C: Cos site; K: KpnI; X: XhoI; S: SalI; B: BamHI; Km: Kanamycin resistant gene; Tc: Tetracycline resistant gene; <: The arrow indicates the inserted direction.

2.2 粪产碱菌 *ntrC-lacZ* 融合基因的构建

如前述, *ntrC* 基因克隆于可转移载体 pLA2917 上, 获得粪产碱菌 *ntrC* 转移载体 pLAC1, 进一步将 *lacZ* 基因连接于 pLAC1 上的 *ntrC* 基因 N 端的 BamHI 位点, 构建 *ntrC-lacZ* 融合基因。其构建步骤如下: (1) pKOK5 质粒上的 BamHI 位点分别在 2380 和 7110 bp 处, 酶切获得 4.73 kb 及 2.65 kb 两个片段, 其中 4.73 kb 片段含完整的 *lacZ* 基因和 Km 抗性基因, 分离获得该片段; (2) 利用 pLAC1 上 BamHI 的单一酶切位点, 完全酶解, 获得载体 DNA 片段, 与上述含 *lacZ* 片段进行连接反应; (3) X-gal 显色筛选兰色菌斑, 获得正向克隆 pLAC2, 图 3、4 示正向克隆 pLAC2 的限制性内切酶结果及其物理图谱。

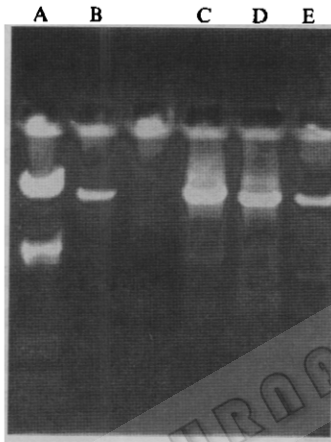


图 3 pLAC2 的限制性内切酶分析

Fig.3 Restriction digestion analysis of pLAC2

A: λ DNA/EcoRI+HindIII; B: pLAC1/BamHI 27.5kb;
C: pLAC2/BamHI 27.5, 4.73kb; D: pLAC2/EcoRI
22.37, 3.86, 3.0kb; E: pLAC1/EcoRI 23.64, 3.86kb.

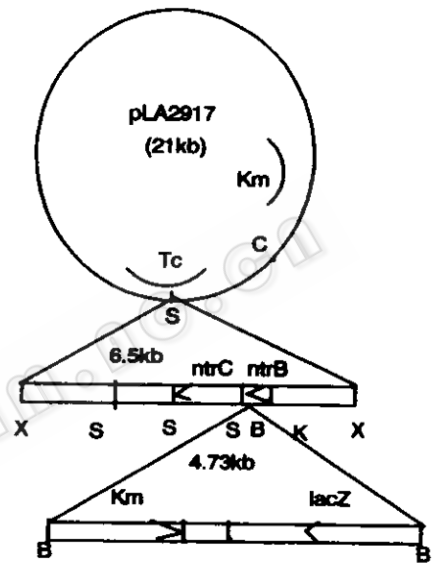


图 4 pLAC2 的物理图谱

C: Cos 位点; Km: 卡那霉素抗性基因; Tc: 四环素抗性基因; <: 表示插入方向。

Fig.4 Physical maps of pLAC2

C: Cos site; K: KpnI; X: XhoI; S: Sall; B: BamHI;
Km: Kanamycin resistant gene; Tc: Tetracycline resistant gene; <: The arrow indicates the inserted direction.

2.3 pLC1 和 pLC2 导入粪产碱菌 A1501 中

经两亲结合试验将携带 *ntrC* 基因的转移载体 pLAC1 和 *ntrC-lacZ* 融合基因表达载体 pLAC2 转到 A1501 中, 利用限制性培养基及 Km 抗性筛选, 获得能在含 Km 的限制性培养基上生长的结合子 A15C1 和 A15C2。A1501 对卡那霉素抗性的随机突变频率低于 10^{-6} , 当倍比稀释大于 10^{-2} 时, 供体菌不能在限制性培养基上生长, pLAC1 在粪产碱菌中的转化频率为 8.3×10^{-3} , pLAC2 为 4.5×10^{-3} 。经三轮单菌落筛选, 获得含 *ntrC* 多拷贝结合子 A15C1 及 *ntrC-lacZ* 融合基因转移载体的结合子 A15C2, 酶切电泳图谱及 *lacZ* 融合基因表达检测结果表明, 上述结合子确实含有导入的转移载体和目的基因。

2.4 *ntrC-lacZ*在水稻根部的表达

粪产碱菌对水稻根有较强的结合能力,在主侧根、根冠、伸长区均可观察到粪产碱菌的存在,并且 *ntrC-lacZ* 融合基因在水稻根际微环境条件下能高水平表达(图版 I)。为进一步了解粪产碱菌在水稻根内的分布及 *ntrC* 表达情况,对接种水稻根进行石蜡横切和纵切观察,结果表明:粪产碱菌 A15C2 可进入水稻根内定殖。在皮层薄壁细胞区及侧根分生区 *ntrC-lacZ* 融合基因表达活性明显要高于别的部位,可能在这些区域的微环境条件有利于固氮作用,从而使作为正调节因子的 *ntrC* 基因高水平表达(图版中箭头所示),这尚有待于进一步研究。

2.5 *ntrC* 基因在粪产碱菌根部定殖过程中的作用

ntrC 基因具有正调节固氮菌一般代谢和生物固氮过程的双重功能,但其表达量增加或减少对固氮菌在根表的联合特性有何影响尚无定论^[4,12]。为了探讨 *ntrC* 在根部定殖中的作用,采用表达量增倍的多拷贝结合子和表达量减少的部分缺失突变株开展相关研究,其中多拷贝 *ntrC* 结合子中因 *ntrC* 在多拷贝质粒上,其拷贝数随质粒数的变化而变化,在高铵条件下 *ntrC* 拷贝数的增加有可能提高结合子的固氮活性和在根表定殖能力。*ntrC* 部分缺失突变株系本研究组通过构建 *ntrC* 缺失的自杀性质粒并将该质粒导入粪产碱菌野生型中,经同源重组双交换获得,通过对 *ntrC* 突变株的观察可以从另一方面说明 *ntrC* 在固氮调节过程中所起的作用。

对粪产碱菌野生型、多拷贝 *ntrC* 结合子和 *ntrC* 突变株进行扫描电镜观察和根表定殖菌数统计,结果表明在无铵条件下,粪产碱菌野生型与多拷贝 *ntrC* 结合子和水稻根表有较强的结合能力,特别是在水稻主、侧根交界处有大量的粪产碱菌菌体聚集。在高铵条件下,根部定殖菌数大大减少,但多拷贝 *ntrC* 结合子能力大于野生型,通过根部定殖菌体平板计数表明,无论在无铵或高铵条件下 *ntrC* 突变株定殖能力均比多拷贝结合子低一个数量级(表 2,图 5),表明 *ntrC* 基因可能参与根表定殖过程。

表2 NH_4^+ 对粪产碱菌野生型、*ntrC* 突变株及多拷贝 *ntrC* 结合子根表定殖能力的影响

Table 2 Effect of NH_4^+ on colonization of A1501, *ntrC* mutant and multi-copy *ntrC* conjugation to rice roots

菌株 Strain	$-\text{NH}_4^+$	15 mmol/L NH_4^+
A1501	2.4×10^9	1.4×10^9
A15C1	5.1×10^9	3.8×10^9
A15CMI	6.9×10^8	3.9×10^8

Vande 等^[13]曾研究巴西固氮螺菌与小麦根联合过程中 *nifH* 的表达情况。Arsene 等^[14]采用 *lacZ* 融合基因和 X-gal 原位显色技术,研究了野生型和各种突变型中 *nifH* 在根表的表达差异,结果发现野生型 *nifH-lacZ* 融合基因的在根表表达明显高于 *nifA* 或 *glnB* 突变型,而 *nifA-Th5* 突变株在根表的定殖率与野生型无明显差异,但谷氨酰胺依赖型和色氨酸依赖型突变株在根表的定殖能力大大减弱。本研究表明在水稻主侧根伸长区及根内皮层薄壁细胞及侧根分生区 *ntrC-lacZ* 融合基因表达活性高于别的部位。在高铵条件下水稻根部定殖菌数是多拷贝 *ntrC* 结合能力大于野生型,而 *ntrC* 突变株定殖能力低于野生型。这表明在根表定殖过程中涉及一系列细菌基因如 *ntrC*、*nifA*、*gln* 等的表达,其基因产物

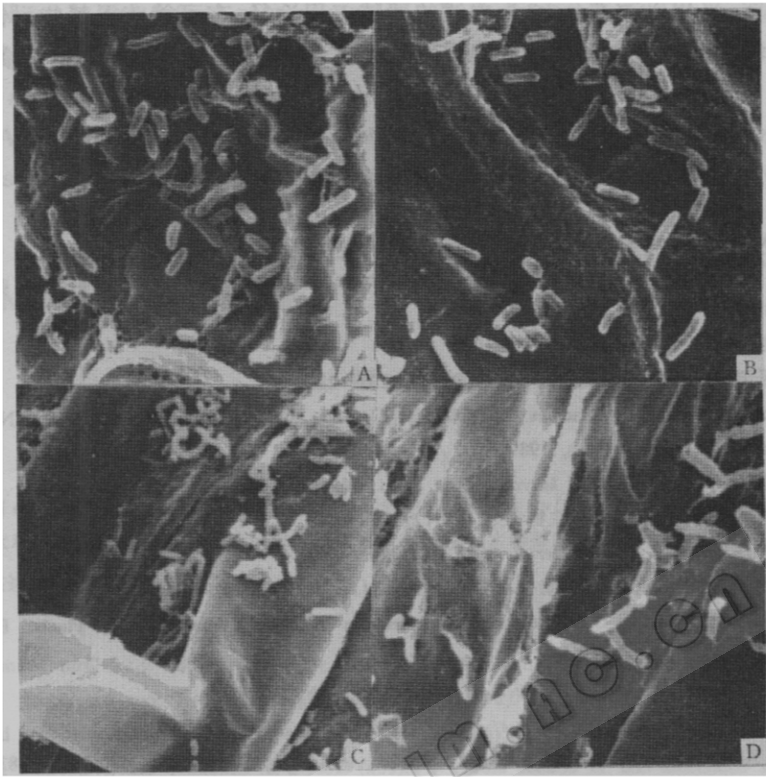


图5 高铵(15mmol / L NH_4^+)下粪产碱菌野生型 A1501、*ntrC*突变株及多拷贝 *ntrC*结合子在水稻根表的扫描电镜照片

A: 无铵 + A1501; B: 15mmol / L NH_4^+ + A1501; C: 15mmol / L NH_4^+ + 多拷贝 *ntrC*结合子;
D: 15mmol / L NH_4^+ + *ntrC*突变株.

Fig.5 SEM photos of colonization of A1501, *ntrC* mutant and multi-copy *ntrC* conjugation to rice roots under 15 mmol / L NH_4^+

A: Non-ammonia; B: 15mmol / L NH_4^+ + A1501; C: 15mmol / L NH_4^+ + multi-copy *ntrC* conjugatants; D: 15mmol / L NH_4^+ + *ntrC* mutant.

在根表结合过程中起着重要作用。

影响与联合固氮菌结合并定殖于根表有关的基因表达的因素很多,包括土著微生物竞争,根分泌物组份及土壤中有有机或无机含氮等^[3]。在耕作条件下,氮肥种类及施用量对根际固氮菌在水稻根表的结合能力有十分显著的影响,根际土壤中氮或铵的含量是根表定殖的主要限制因子。铵对联合固氮菌的固氮活性和根表定殖能力的抑制作用已被实验室和田间试验结果所证实,在有铵(15mmol / L NH_4^+)存在条件下,菌体的根表结合能力大大降低,某些定殖细菌甚至从根表脱离^[5]。据报道通过对固氮正调节基因 *nifA* 启动子的改造或增加 *nifA* 在细胞中的拷贝数,可获得在高铵下保持一定固氮活性和根表定殖能力的耐铵工程菌^[15]。*ntrC* 基因具有类似 *nifA* 的固氮正调节功能,这在固氮克氏杆菌和固氮粪产碱菌中已得到证实^[16]。前已报道,多拷贝 *ntrC* 结合子在高铵下保持一定的固氮活性^[16],本工作进一步证明这种耐铵固氮菌株在高铵下亦能保持较强的根表定殖能力。上

述结果亦表明,采用以改造 *ntrC* 为主线的遗传工程途径,有可能获得某些耐铵固氮菌株,其在土壤环境中能与宿主作物建立稳定的联合体系,从而保持高效的联合固氮效率。

参 考 文 献

- [1] Patriquin D G, Dobereiner J, Jain D K. *Can J Microbiol*, 1983, 29: 900~915.
- [2] Okon Y. *Trends Biotechnol*, 1985, 3: 223~228.
- [3] Michiel K, Verderleyden J, Van Gool A. *Biol Fertil Soils*, 1989, 8: 356~368.
- [4] Elmerich C, Zimmer W, Vieille C. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall, 1992, 212~258.
- [5] 林 敏, 尤崇杓. 核农学报, 1993, 7: 98~104.
- [6] 林 敏, 平淑珍, 尤崇杓. 植物生理学报, 1992, 3: 233~238.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Franche C, Elmerich C. *FEMS Microbiol Lett*, 1981, 10: 199~202.
- [9] 丘元盛, 周淑萍, 莫小真, 等. 微生物学报, 1981, 21: 468~472.
- [10] Allen L N, Hanson R S. *J Bacteriol*, 1985, 161: 955~962.
- [11] 程红梅, 林 敏, 尤崇杓. 农业生物技术学报, 1995, 3(1): 42~46.
- [12] Dobereiner J, Pedrosa F O. *Nitrogen-fixing Bacteria in Non-leguminous Crop Plants*. Berlin: Springer Verlag Science techpublishers, 1987.
- [13] Vande B, Elmerich C. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1993, 6: 592~600.
- [14] Arsen F, Katupitiya S, Kennedy I R *et al*. *MPMI*, 1994, 6: 748~962.
- [15] Bosworth A H, Williams M K, Albercht K A *et al*. *Appl Envir Micro*, 1994, 60: 3815~3832.
- [16] 程红梅, 林 敏, 贾士荣. 农业生物技术学报, 1996, 4(1): 81~86.

THE CONSTRUCTION OF *ALCALIGENES FAECALIS ntrC-lacZ* FUSION GENE AND ITS EXPRESSION DURING ASSOCIATION WITH RICE ROOTS

Cheng Hongmei¹ Lin Min¹ Ping Shuzhen¹ Elmerich C³ Jia Shirong²

(¹Institute for Application of Atomic Energy, CAAS, Beijing 100094)

(²Biotechnology Research Center, CAAS, Beijing 100081)

(³Institute Pasteur, France)

Abstract A broad host range vector pLA2917 containing *ntrC* gene or *ntrC-lacZ* fusion were constructed, namely pLAC1 and pLAC2. The plasmids pLAC1 and pLAC2 were introduced into *A. faecalis* wild type strain A1501 by conjugation, subsequently to obtain A15C1 and A15C2. The expression and regulation of *ntrC* gene of *A. faecalis* associated with rice roots was investigated under the condition of the associative nitrogen fixation using X-Gal decoration method, micrograph and *ntrC* partially deletion mutant. The blue precipitation was strongly existed in parenchyma

cells as well as in the lateral root primordial. It showed that *ntrC* gene could express at much higher level in these sites. In the presence of ammonia, the number of multi-copy *ntrC* conjugatants colonized on surface of rice roots is higher than that of wild type A1501, and the colonization of *ntrC* mutant is weakest among these three strains. This provided an evidence that *ntrC* gene might be involved in procedure of colonization of *A. faecalis* to rice roots.

Key words *Alcaligenes faecalis*, *ntrC-lacZ* fusion gene, *ntrC* mutant, Expression and regulation, Multi-copy *ntrC* conjugatant

图 版 说 明

Explanation of plate

图 版 I

粪产碱菌 *ntrC-lacZ* 融合基因在水稻根表及内根际表达 A: 接种含 *ntrC-lacZ* 融合基因结合子水稻根; B: 接种水稻根的横切面; C: 接种水稻根的纵切面; D: 未接种水稻根的横切面。蓝色示 *ntrC-lacZ* 融合基因的表达, 箭头示侧根分生区。

Plate I

Expression of *ntrC-lacZ* fusion gene of *A. faecalis* on the surface or the endorhizosphere of rice roots A: Inoculated root with transconjugatant contained *ntrC-lacZ* (x66); B: Cross section of inoculated root with transconjugatant contained *ntrC-lacZ* (x66); C: Longitudinal section of inoculated root with transconjugatant contained *ntrC-lacZ* (x33); D: Cross section of non-inoculated root (x66). The blue indicates the site of expression of *ntrC-lacZ* and the arrow indicates the site of the lateral root primordia.