

紫云英根瘤菌由种子浸提物诱导的基因调控片段的克隆和分析*

农 广** 张 忠 明 胡 福 荣 陈 华 癸

(华中农业大学农业微生物重点开放实验室 武汉 430070)

关键词 紫云英根瘤菌, 种子浸提物, DIG 杂交 lacZ 融合

分类号 Q933, Q78

在豆科植物中, 种子浸提物和根系分泌物都能诱导根瘤菌的早期结瘤基因的表达, 这因为它们都含有起诱导作用的黄酮类物质。作为植物的共生信号, 黄酮类物质与根瘤菌的结瘤调节基因 *nodD* 的产物一起, 诱导结瘤基因 *nodABC* 等的表达, 跟着形成根瘤菌结瘤因子——脂寡糖分子, 结瘤因子分泌到菌体外并作用于根尖, 诱导根瘤的形成。

紫云英根瘤菌的早期结瘤阶段, 同样受黄酮类物质的诱导, 并产生结瘤因子, 引起根毛变形^[1]。本研究通过在表达型载体 pMP220 对 7653R 菌株的共生质粒 DNA 片段进行克隆, 利用结瘤基因诱导物(寄主植物种子浸提物)筛选具有调控表达活性的片段, 获得一株种子浸提物对其有诱导效应的菌株 HN18, 对该菌株所含的融合质粒 pHN18 进行 *nodDABC* 探针杂交, 发现有一条 1.7kb 的阳性杂交带, 表明在 pHN18 中克隆有结瘤基因启动子。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

紫云英根瘤菌 (*Rhizobium huakuii*) 有效结瘤菌株 7653R 和大肠杆菌 DH5 α 为本室保存; HN10, HN18, HN46, HN49 和 HN14 为含有 lacZ 融合子的 7653R 菌株(本研究); 质粒 pHN18 是从 HN18 菌株分离到的 lacZ 融合质粒(本研究)。pMP220 为无启动子的 lacZ 转录表达载体, 四环素抗性; pRK2013 为三亲结合转移的协助质粒; pIJ1216 含豌豆根瘤菌 *nodDABC* 基因片段于 pKT230 载体上, 卡那霉素抗性。后三种质粒均为本室保存。

1.2 培养基

培养大肠杆菌用 LB 培养基^[2], 培养根瘤菌用 SM^[3] 和 S40 培养基^[4]。

1.3 lacZ 融合子库的构建和三亲转移接合子的筛选

按 Hirsch 法^[5]提取根瘤菌大质粒, EcoRI 酶切 2 h, 将 DNA 片段与载体 pMP220 连接, 酶连物转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 在含 Tc(10 μ g / ml) 的 LB 平板上筛选抗性菌落, 从而获得 7653R 大质粒的 lacZ 融合子库。以 lacZ 融合子库为供体, 根瘤菌 7653R 菌株为受体, 在 pRK2013 质粒的协助下, 将 lacZ 融合子导入到 7653R 菌株中。在加有 X-gal(100 μ g / ml)、植物种子浸提物(20 μ l / ml)、抗生素 Sm(100 μ g / ml) 和

* 国家攀登计划及国家自然科学基金资助项目。

** 农广现在中山大学生物防治国家重点实验室作博士后。

收稿日期: 1996-10-28

Tc(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的根瘤菌基本培养基(SM)上筛选蓝色菌落。

1.4 种子浸提物的制备

取 3 g 紫云英种子洗干净,用 70% 酒精表面消毒,然后用 10 ml 无菌水浸泡两天,吸取棕黄色浸泡液,加无菌水至 10 ml,过滤灭菌,于 4℃ 贮存。

1.5 β -半乳糖苷酶活性测定

将样品菌株活化,再转移至 S40 根瘤菌液体培养基培养 24 h,在 600 nm 波长测定 OD 值,再将细菌稀释至 OD 值为 0.1,每个样本取两份 5 ml,一份加入种子浸提物 100 μl ,另一份加等量无菌水为对照,28℃ 振荡培养 10~24 h,然后按 Miller^[6]方法计算 β -半乳糖苷酶活性。

1.6 重组质粒的分离,酶切和 *nod* 探针杂交

从菌株 HN18 提取质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,在含有 Tc(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LB 平板上筛选抗性菌落,挑取菌落进行小量制备质粒 DNA,再进行内切酶分析,使用宝灵曼公司的地高辛标记和检测盒进行杂交分析,并按所附说明书进行操作。

2 结果和讨论

2.1 根瘤菌三亲转移接合子中 *lacZ* 融合子蓝色菌落的筛选

以 *lacZ* 融合子库为供体,7653R 菌株为受体,筛选并得到了蓝色菌落(图略)。通过平板计数,融合子向根瘤菌转移的频率约为 10^{-5} ,其中诱导表达所产生的蓝色菌落占三亲转移接合子的 1%。分别挑取蓝色和白色的菌落到同样的平板纯化,继代培养证实颜色是稳定的。

2.2 蓝色菌落菌株的 β -半乳糖苷酶活性测定

将分别命名为 HN10、HN18、HN46、HN49 和 HN114 的五个菌株,测定其 β -半乳糖苷酶活性,结果(表

表1 蓝色菌落 β -半乳糖苷酶活性的诱导效应*

菌株	β -半乳糖苷酶活性(U)	
	加种子浸提物	无种子浸提物
7653R	3 \pm 0.3	4 \pm 1.0
HN10	7 \pm 1.5	95 \pm 27.4
HN18	105 \pm 18.4	42 \pm 1.7
HN46	31 \pm 3.3	76 \pm 3.3
HN49	66 \pm 7.0	58 \pm 4.6
HN114	71 \pm 6.7	65 \pm 11.4

* 实验设三次重复

1) 表明,在有或无诱导物时,HN49 和 HN114 的酶活没有显著差别,表现无诱导效应。有诱导物的 HN18 菌株比无诱导物的酶活高 2.5 倍,表现出诱导效应;无诱导物的 HN10 和 HN46 比有诱导物的酶活高 12.7 倍或 2.4 倍,说明诱导物对酶活有明显的抑制作用。各样本的酶活均明显高于对照菌株 7653R 的酶活。

实验结果显示,HN18 菌株的融合质粒上会含有根瘤菌结瘤基因的启动子及

调控序列,其它几个菌株中所克隆到的启动子则与 *nod* 基因无关。

2.3 重组质粒的酶切和 *nod* 探针杂交

图 1-A 电泳结果显示,从 HN18 菌株分离到的重组质粒 pHN18 含有外源片段。以豌豆根瘤菌 *nodDABC* 基因片段为探针进行 DIG 杂交,图 1-B 杂交结果显示,pHN18 有一条约 1.7kb 的阳性带,说明菌株 HN18 的质粒 pHN18 含有 *nod* 基因片段。

在 *lacZ* 融合子库的构建中,所用表达载体 pMP220 只有 *lacZ* 基因及编码核糖体结合位点的序列而缺乏启动子和操作基因,因此没有表达 *lacZ* 的能力。只有在 7653R 菌株大质粒上具有启动子活性的片段融合到载体 pMP220 的 *lacZ* 基因上游,才能表达 β -半乳糖苷酶活性,*lacZ* 基因的表达水平由克隆到的调控序列的转录能力所决定。当克隆到早期结瘤基因时,黄酮类诱导物可激发 *nod* 基因的表达,从而带动

lacZ 的表达。

从所筛选到的菌株可看到,种子浸提物对 HN18 菌株有诱导效应,表现出黄酮类物质对早期结瘤基因表达的激发作用,同时也发现种子浸提物还有不同的诱导效应。由此可见,种子浸提物对早期结瘤有诱导作用,但其所含的成分并不局限于诱导早期结瘤作用,可能还有其它的诱导效应。进一步的探针杂交结果表明,从所筛选到的 HN18 菌株分离得到的重组质粒 pHN18 含有早期结瘤基因调控片段,诱导作用的结果和分子杂交的结论是相一致的。

2.4 重组质粒 pHN18 的 lacZ 诱导活性验证

将重组质粒 pHN18 经三亲接合再导入受体菌株 7653R,在含诱导物的培养基上筛选到的三亲转移接合子均为蓝色,挑取菌落到同样的培养基继代培养,菌落仍显示蓝色。而出发菌株 7653R 则是白色(图略)。

重组质粒 pHN18 再导入受体根瘤菌的结果再次说明,pHN18 具有早期结瘤基因所表现的诱导表达活性,在功能上对前面的结果进行了复证。

参 考 文 献

- [1] 杨国平,朱 军,娄无忌. 微生物学报, 1994, 34(5): 406~408.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. A. 1.
- [3] 周俊初,张忠明,陈华葵等. 华中农业大学学报, 1987, 6: 156~164.
- [4] Aguilar O M, Kapp D, Puhler A. *J Bacteriol*, 1985, 164:245~254.
- [5] Hirsch P K, von Montagu M, Johnston A W B *et al.* *J Gen Microbiol*, 1980, 120: 403~412.
- [6] Miller J T. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 352~355.

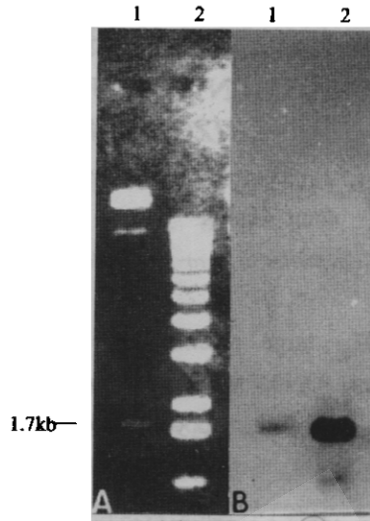


图 1 融合质粒 pHN18 的酶切分析和 nod 探针的 DIG 杂交

Fig. 1-A Digestion of fusion plasmid pHN18 with EcoRI

lane 1. pHN18+EcoRI; lane 2. 1kb ladder marker.

Fig. 1-B Hybridization with nodDABC probe

lane 1. pHN18+EcoRI; lane 2. 1kb ladder marker.

**CLONING AND ANALYSIS OF THE REGULATORY GENE
FRAGMENT INDUCED WITH SEED EXTRACT IN
RHIZOBIUM HUAKUII STRAIN 7653R**

Nong Guang Zhang Zhongming Hu Furong Chen Huakui

(Laboratories of Agro-Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract The large plasmids of strain 7653R were digested with restriction enzyme EcoRI. Their DNA fragments were cloned into the expression vector pMP220 to construct a lacZ fusion pool, which were transferred into the recipient strain 7653R. Tri-transconjugants were selected onto plates containing X-gal and seed extract. Five blue colonies were assayed of their β -galactosidase activity after incubation with or without seed extract. A positive induced strain HN18 was obtained. Hybridization of *nod*DABC probe on the recombinant plasmid pHN18 showed a 1.7kb positive band. The evidence makes a deduction that the pHN18 contains a promoter of *nod* operon.

Key words *Rhizobium huakuii*, Seed extract, DIG hybridization, lacZ fusion