

苜蓿中华根瘤菌与耐盐有关的 DNA 片段的克隆*

陈雪松 张海瑜 高为民 朱 坤 阚凤玲 杨苏声

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)

摘 要 以耐盐的苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)042B 为材料,制备其总 DNA 经限制性地内切酶 *EcoR* I 的部分酶解,利用电洗脱方法回收 15~25kb 大小的 DNA 片段。以碱法制备载体质粒 pLAFR I,用 *EcoR* I 将其切成线状,然后用 T₄DNA 连接酶将回收片段与线状载体连接,利用包装蛋白进行包装后,感染大肠杆菌(*Escherichia coli*)S17-1,构建了 042B 的基因文库。以固体亚硝基胍作为诱变剂处理出发菌株,在 0.5mol/LNaCl 的条件下,从 2000 个菌落中筛选得到 12 株 042B 的盐敏感突变株,以其中稳定的盐敏感突变株 GZ17 为受体菌,利用两亲本杂交将含有 042B 的 DNA 片段的 pLAFR I 重组质粒转移到 GZ17 中,在含有四环素和 0.5mol/LNaCl 的基本培养基上筛选出能够耐盐的阳性克隆,获得了与耐盐有关的 7kb 长的 DNA 片段。对该片段进行亚克隆,最终获得了 4kb 与耐盐有关的片段。

关键词 苜蓿中华根瘤菌,耐盐,基因文库,亚克隆

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0489-94

八十年代以来,细菌耐盐机制的研究日益深入。以大肠杆菌和其它遗传背景较清楚的肠道细菌为材料进行的工作,使细菌渗透调节机理的研究推进到分子水平,已相继分离和鉴定了与渗透保护物合成途径有关的结构基因,如 *proABC* 和 *bet* 基因,以及转录表达受到渗透压调控的一些操纵子,如 *kdp* 操纵子、*pro* 和 *opu* 系统以及作为全细胞调节因素的 *ompR* 系统^[1,2]。然而,对于有重要经济价值的根瘤菌而言,研究工作基本上仍集中在根瘤菌对渗透胁迫的生理学反应以及相关渗透保护物质的鉴定方面^[3]。最近发现和鉴定了苜蓿中华根瘤菌壁膜间隙葡聚糖的合成基因 *ndvA* 和 *ndvB*,但对其调控机制还不清楚^[4]。由于高盐、干旱等不利条件使根瘤菌的存活和其共生结瘤固氮能力均有下降^[5],因此,为了充分发挥根瘤菌的共生固氮潜力,进一步研究其渗透调节机制,尤其是分离和鉴定有关渗透调节基因,对于构建耐盐高效的根瘤菌,以及在此基础上构建耐盐植物,进而充分利用盐碱土壤具有重要的意义。

苜蓿中华根瘤菌 042B 分离自新疆的和田苜蓿^[6],具有良好的耐盐性状,在基本培养基中能耐 0.5mol/L NaCl,在完全培养基上能耐 0.8mol/L NaCl。在高渗透胁迫下,其细胞内可积累大量谷氨酸,而且外源性的谷氨酸和甘氨酸甜菜碱具有协同效应,可减轻高盐对其生长的抑制作用^[7]。通过 pSUP5011 及辅助质粒 RP4 的作用,本实验室将 Tn5-Mob 随机插入 042B 基因组中,再经三亲本杂交将 042B 的 DNA 片段引入慢生大豆根瘤菌 USDA110 中,获得生长快且耐高盐的接合子^[8]。

* 高等学校博士学科点专项科研基金和欧盟基金项目资助(No. IC18CT960103)

收稿日期:1998-08-03,修回日期:1999-01-28

本研究利用能在革兰氏阴性菌中转移和复制的广谱寄主载体 pLAFRI 构建了该菌的基因文库。通过接合转移使文库菌与 042B 的盐敏突变株互补,以期从文库中分离出与渗透有关的 DNA 片段,为 DNA 测序及最终获得渗透基因打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

列于表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	有关特性 Relevant characteristics	来源 Sources
<i>S. meliloti</i> 042B	Growth in FY medium with 0.5mol/L NaCl	This laboratory
<i>E. coli</i> S17-1	<i>pro</i> ⁻	Chinese Academy of Agricultural Sciences
pLAFRI	Tc ^r , <i>mob</i> ⁺ , <i>tra</i> ⁻	University of East Anglia
pML122	Gm ^r , Nm ^r , <i>mob</i> ⁺	University of East Anglia
GZ17	Salt sensitive mutant	This study
042B-K4	Transconjugant containing 7kb DNA fragment related to salt tolerance	This study
G6	Transformant containing 4kb DNA fragment related to salt tolerance	This study
G8	Transconjugant containing 4kb DNA fragment related to salt tolerance	This study

1.2 培养基

TY 培养基^[9]用于根瘤菌的培养, LB 培养基^[10]用于大肠杆菌的培养, FY 培养基^[8]为基本培养基,用于根瘤菌接合子及其盐敏突变株的筛选(其中加入 0.5mol/L NaCl)

1.3 DNA 的体外操作

042B 总 DNA 的制备参照 Meade^[11]的方法进行。部分酶解片段的回收和纯化、质粒的碱法提取和去磷酸化、DNA 片段的回收和载体质粒的连接均参照文献 10 进行。使用购自 Promega 的 λ 噬菌体头部蛋白包装连接产物,并感染受体大肠杆菌 S17-1,其方法均按照试剂盒使用说明书进行。

1.4 质粒 DNA 的转移

通过滤膜杂交方法^[12]进行质粒的接合转移。大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒 DNA 的转化均参照文献 10 进行。

1.5 042B 盐敏突变株的诱变和筛选

使用固体亚硝基胍法诱变 042B,方法与参考文献 13 相同。

2 结果和讨论

2.1 苜蓿中华根瘤菌 042B 基因文库的构建

提取 042B 的总 DNA,经电泳检查,其 DNA 片段大于 50kb。经紫外分光光度计测定 $OD_{260}/OD_{280} = 1.796$, $OD_{260}/OD_{230} = 2.0$ 表明所提的 DNA 纯度合乎要求,并测得其浓度约为 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取 $10\mu\text{g}$ DNA 进行 *Eco*R I 部分酶切试验,确定获得 15~25kb DNA

片段的最适酶用量为第 7 管的浓度(图 1),即 $0.078\mu\text{L}/\mu\text{g}$ DNA。用最适酶浓度的一半进行大量酶切,然后在 0.5% 琼脂糖凝胶中电泳,以电泳脱法回收片段,纯化后得到大小约为 15~25kb 的片段。

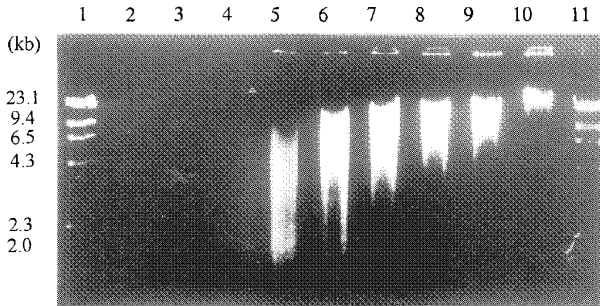


图 1 *S. meliloti* 042B 总 DNA 的部分酶切图谱

Fig. 1 Total DNA of *S. meliloti* 042B partially digested by *EcoRI*

1. λ /*Hind* III Marker ; 2. DNA+5u *EcoRI* ; 3. DNA+2.5u *EcoRI* ; 4. DNA+1.25u *EcoRI* ;
5. DNA+0.625u *EcoRI* ; 6. DNA+0.3125u *EcoRI* ; 7. DNA+0.156u *EcoRI* ; 8. DNA+0.078u *EcoRI* ;
9. DNA+0.039u *EcoRI* ; 10. DNA+0.0145u *EcoRI* ; 11. λ DNA/*Hind* III Marker.

用碱法提取 pLAFRI,并用 *EcoRI* 完全酶切,使之成线状,然后用碱性磷酸酶处理,以防止线状质粒的自我环化。pLAFRI 和 042B 的回收片段以 1:2 混合,在 T_4 DNA 连接酶作用下进行连接。连接产物包装后,立即转染大肠杆菌 S17-1,在含 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素的 LB 平板上共获得抗性菌落 8.0×10^3 个。随机挑取 20 个菌落,以碱法提取质粒后,经 *EcoRI* 完全酶切。电泳检查发现,有 19 个菌落的质粒含有插入的外源片段(图 2),因此,重组子大约占 95%。以此推算,含有外源片段的全部基因文库菌数为 $8.0 \times 10^3 \times 95\% = 7600$ 。

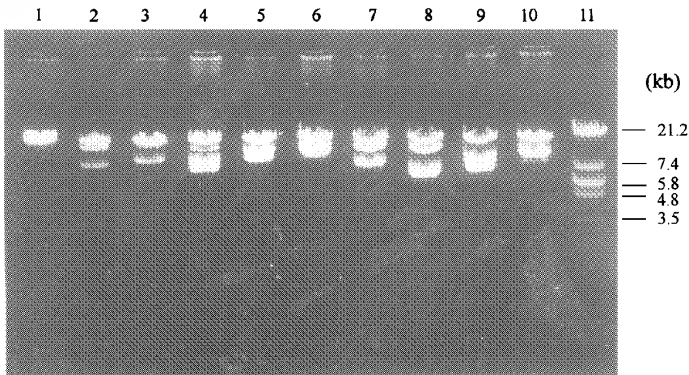


图 2 *S. meliloti* 042B 基因文库的电泳检测

Fig. 2 The gel electrophoresis analysis of gene library of *S. meliloti* 042B

- 1~10 pLAFRI and inserted fragments ; 11. λ DNA/*EcoRI* Marker.

在理论上,对构建的基因文库质量的评估用 Clarke 的公式^[12]进行计算。对于根瘤菌而言,其基因组大小估计为 3500kb^[11]。在实验中所获得的外源插入片段的平均长度为

23kb, 如果以 99.99% 的概率筛选到某个外源片段的标准来计算, 文库中含有的克隆数应为 1500 个。在本实验构建的基因文库中, 重组子已达 7 600, 远远超过理论上应含有的数目, 说明构建的基因文库符合要求, 包含了 042B 的整个基因组。

2.2 042B 盐敏感突变株的筛选

由于根瘤菌的营养状况与耐盐性有关^[6], 我们选用营养较贫乏的 FY 培养基为筛选盐敏感突变株的培养基, 并使其所含的 NaCl 浓度达到 0.5mol/L NaCl, 此为野生型 042B 在此营养条件下所能耐受的最大浓度。

在不含 NaCl 和含 0.5mol/L NaCl 的 FY 平板上, 分别对应地点种 2 000 多个经亚硝基胍处理后在 TY 平板上长出的 042B 单菌落, 在 28℃ 培养 7d 后, 选择在含 0.5mol/L NaCl 的 FY 平板上不生长, 而在不含 NaCl 的 FY 平板上生长的菌落, 经反复划线验证, 以及在含 0.5mol/L NaCl 的 FY 液体中与野生型 042B 做生长曲线对比测定, 确证其中 12 株为稳定的盐敏突变株。在本研究中选用其中的 1 株作为后续实验材料, 编号为 GZ17, 经检测, 其回复突变率为 3.17×10^{-10} 。

2.3 阳性克隆的筛选及鉴定

将基因文库菌与盐敏突变株 GZ17 杂交, 在含 20 μ g/mL 四环素和 0.5mol/L NaCl 的 FY 平板上, 经 28℃ 培养 8d 后, 长出约 100 个菌落。挑取其中几个菌落提取质粒, 并经 *Eco*R I 酶切后电泳, 发现均含有外源片段, 大小在 5~25kb 之间。为了确证是否获得了恢复耐盐性状的阳性克隆, 选择其中的 042B-K4 菌株接种在含 0.5mol/L NaCl 的 FY 液体中, 于摇床培养 6d。同时, 以野生型 042B 和盐敏突变株 GZ17 为对照, 测得三者的 OD_{420} 值分别为 0.417、0.743 和 0.064, 其中 042B 和 042B-K4 的 OD_{420} 值接近, 而 GZ17 在此条件下几乎未见生长, 表明 042B-K4 确为阳性克隆。

为了便于后续的遗传操作, 采用碱法提取 042B-K4 的重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 S17-1, 于含 20 μ g/mL 四环素的 LB 平板上获得近 1000 个转化子。经检测, 转化子中的重组 pLAFRI 质粒含有 7kb 外源 DNA 片段, 将其编号为 pZK-4 (图 3)。

2.4 耐盐有关片段的亚克隆

碱法提取 pZK-4 重组质粒, 用多种限制性内切酶酶切。电泳检测发现, *Cla* I、*Sac* I、*Pst* I、*Bgl* II、*Bam*HI 均可从 7kb DNA 切下小片段, 由于 *Cla* I 所切的片段单一, 且大小适中, 故选作亚克隆用酶(图 4)。

提取含耐盐有关片段的 pLAFRI 质粒及亚克隆载体 pML122, 均用 *Cla* I 完全酶切, 以碱性磷酸酶处理上述 pML122, 防止自连。将 pLAFRI 和 pML122 以 2:1 混和, 用 *T*₄DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 S17-1, 在含 20 μ g/mL 庆大霉素的 LB 平板筛选转化子, 并逐个点种于含 20 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板, 找出抗庆大霉素而对卡那霉素敏感的转化子, 检测发现

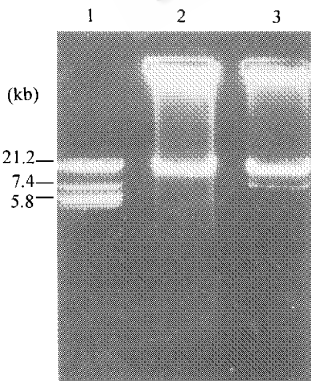


图 3 7kb 与耐盐有关 DNA 片段的电泳图谱

Fig. 3 The electrophoresis profiles of DNA fragment related to salt tolerance

1. λ DNA/*Eco*R I Marker ;
2. pLAFRI I ;
3. pLAFRI I + 7kb DNA fragment.

均含有带 4kb 外源片段的 pML122 质粒, 编号为 G6(图 5)。

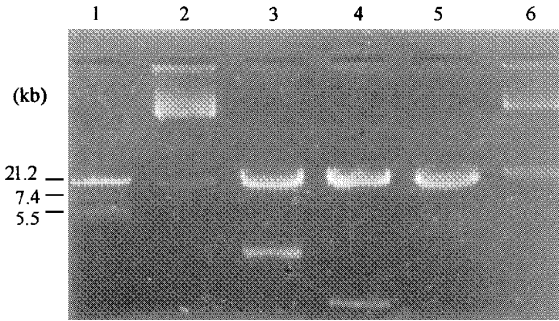


图 4 亚克隆用酶的选择

Fig. 4 The selection of restriction enzyme for subcloning

1. λ DNA/*Eco*R I Marker ; 2. *Bgl* II ; 3. *Cla* I ; 4. *Sac* I ;
5. *Bam*HI ; 6. *Pst* I .

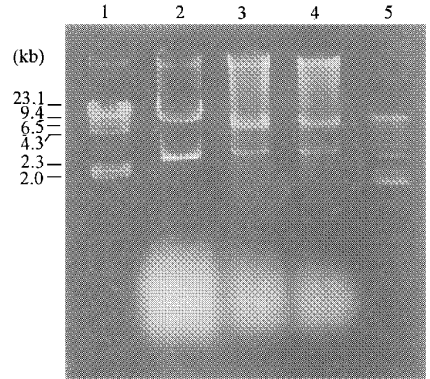


图 5 阳性亚克隆的电泳图谱

Fig. 5 The gel electrophoresis profiles of positive clones

1. λ DNA/*Hind* III Marker 2. G6/*Cla* I
3. G8/*Cla* I 5. Ladder marker.

以 G6 与盐敏突变株 GZ17 进行二亲本杂交, 在含 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素和 $0.5\text{mol}/\text{L}$ NaCl 的 FY 平板培养一周后长出菌落, 镜检为根瘤菌。随机挑取 10 个菌落进行检测, 发现均有带 4kb 片段的 pML122 质粒, 编号为 G8(图 5)。将 G8、042B 和 GZ17 分别接于含 $0.5\text{mol}/\text{L}$ NaCl 的 FY 平板, 发现 042B 和 G6 均可生长, 而 GZ17 不生长, 说明 G8 为接受含 4kb 片段的重组质粒后恢复耐盐性状的阳性克隆。

参 考 文 献

- [1] Csonka L N. *Microbial Rev* , 1989 **53** :121~147.
- [2] Csonka L N , Hanson A D. *Annu Rev Microbiol* , 1991 , **45** :569~606.
- [3] Hua S S , Tsai Y , Lichers G M. *Appl Environ Microbiol* , 1982 **44** :135~140.
- [4] Miller K J , Janet M W. *Annu Rev Microbiol* , 1996 **50** :101~136.
- [5] Steinborn J , Roughley R. *J Appl Bacteriol* , 1974 , **37** :93~99.
- [6] Gao W M , Yang S S. *Microbiol* , 1995 **141** :1957~1962.
- [7] 吴 健, 杨苏声, 李季伦. *微生物学报* , 1993 **33** (3) :260~267.
- [8] 杨苏声, 吴拙如, 高为民等. *生物工程学报* , 1993 **9** (3) :193~197
- [9] Rhonda J H , Michael M , Bruno W S. *J Bacteriol* , 1993 **175** (21) :6945~6952.
- [10] Maniatis T , Fritsch E F , Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [11] Meade H N , Long S R , Ruvkum G B *et al.* *J Bacteriol* , 1982 **149** :114~122.
- [12] Figurski D H , Helinski P R. *Pro Natl Acad Sci USA* , 1979 **76** :1648~1652.
- [13] 孙洪红, 高为民, 杨苏声. *农业生物技术学报* , 1996 **4** (3) :287~292.

CLONING OF DNA FRAGMENT RELATED TO SALT TOLERANCE IN *SINORHIZOBIUM MELILOTI* 042B*

Chen Xuesong Zhang Haiyu Gao Weimin Zhu Kun Kan Fengling Yang Susheng

(*Department of Microbiology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094*)

Abstract Total DNA partially digested by *EcoR* I was prepared for *S. meliloti* 042B, in which 15 ~25kb DNA fragments were collected. Vector pLAFR I was purified and digested by *EcoR* I, and then the various DNA fragments of 042B were ligated with pLAFR I by T₄DNA ligase. Gene library of *S. meliloti* 042B was constructed with pLAFR I using *E. coli* S17-1 as recipient. The number of bacterial recombinants obtained was about 8 000 and 95% of them contained foreign DNA fragments. Using NTG, 042B was mutated on FY plates and 12 sensitive strains were screened at 0.5mol/L NaCl from 2 000 colonies. One of them was named GZ17 and selected as a recipient strain. By biparental mating the foreign DNA fragments were introduced from gene library of strain 042B into recipient strain GZ17 which is sensitive to 0.5mol/L NaCl. Then the transconjugants were grown on FY plates containing tetracycline (20μg/mL) and 0.5mol/L NaCl. A 7kb inserted DNA fragment related to salt tolerance was obtained. In subcloning experiment, a 4kb DNA fragment related to salt tolerance was obtained.

Key words *Sinorhizobium meliloti*, Salt tolerance, Gene library, Subclone

JOURNALS.IM.AC.CN

* The Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education and European Commission as part of the INCO-DC programme (Contract No IC18CT960103)