

固氮酶结构基因在快生型大豆根瘤菌中的定位

丁晓华 傅悦 叶盛钰 洪国藩

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

分离纯化了一批我国快生型大豆根瘤菌,测定了它们的固氮酶活性和寄主专一性,发现相同菌株在不同大豆种植株上的结瘤和固氮活性差异甚大。美国USDA 191和193似寄主专一性较高,在我们所使用的豆种上结瘤能力很低,固氮活性也不高。对根瘤菌中巨型质粒的数量分布进行了分离分析,表明所有快生型大豆根瘤菌都包含1—3个巨型质粒(分子量范围:30—250Md)。用含有固氮酶结构基因的质粒 pSA30作为探针对巨型质粒进行杂交,结果表明即使是快生型大豆根瘤菌,固氮酶结构基因也并不一定定位于巨型质粒上。另外,在若干菌株中发现pSA30与二个巨型质粒同时杂交,表明有可能nif HDK或其部分基因的拷贝是分散的。

关键词 快生型大豆根瘤菌;巨型质粒;固氮酶;固氮酶结构基因

根瘤菌与豆科植物共生固氮是现今已知的在农业上最为有效的生物固氮体系。根瘤菌一般有快生型和慢生型两类。豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*), 苜蓿根瘤菌 (*R. melilotii*)·菜豆根瘤菌 (*R. phaseoli*) 和三叶草根瘤菌 (*R. trifolii*) 等属于前者。以前一直认为大豆根瘤菌 (*R. japonicum*)是慢生型的,可是1982年H.H. Keyser等在被认为可能是大豆发源地的中国中、东部一些省份分离到了快生型大豆根瘤菌^[1]。

我们从上海近郊的大豆植株根瘤中筛选分离得到一批快生型根瘤菌菌株,并对其中一些菌株的固氮能力进行测定,对其巨型质粒(megaplasmid)进行抽提,分析,还利用固氮酶结构基因(nif HDK)探明固氮基因的位置。我们发现,相同菌株在不同品系豆种植株上的结瘤及固氮活性差异甚大;美国USDA191和193似寄主专一性较高,在我们所用豆种上结瘤能力很差,固氮活性也较低;所有快生型的大豆根瘤菌都含有1—3个巨型质粒,这些

情形与豌豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌等快生型根瘤菌类同^[2-4],但发现(a)固氮酶结构基因并不一定都定位在巨型质粒上,(b)如果定位在巨型质粒上则全部都定位在最大一个巨型质粒上。另外,也发现固氮酶结构基因在某些固氮菌株中也可能分散定位在2个巨型质粒上。

材料与方 法

(一) 大豆根瘤菌的培养基和培养条件

大豆根瘤菌在27℃恒温培养在YEM培养基^[5]上,其成分为(%) : 甘露醇 1, 酵母膏 0.04, NaCl 0.01, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.65, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $CaCO_3$ 0.3, pH7.0 或培养在TY培养基上,其成分为(%) : 胰胨 0.5, 酵母膏 0.3, $CaCl_2$ 6mM; pH7.0, 摇瓶培养(200转/min)。YEM固体培养基(YMA); YEM加1.2%琼脂和 2.5×10^{-8} %刚果红。

本文于1986年7月18日收到。

(二) 从大豆根瘤中分离纯化根瘤菌株

开花期大豆植株采自上海近郊。根瘤用水冲净, 选择中等大小呈粉红色的瘤用刀片切下(带少许根组织)。用75%乙醇浸泡3min, 无菌蒸馏水洗3次, 再用0.1% HgCl₂ (含0.06N HCl) 浸泡5min, 无菌水漂洗10次。碾碎的根瘤涂布在 YMA 平板上, 2—3 天后即可长出菌落。

挑取粘湿和略带白色半透明的单菌落多次划线纯化。

(三) 结瘤实验及固氮酶活力测定

大豆种采用泰兴黑豆、74—52 (南农大提供) 和78-17(上海县种子站提供), 选择饱满、完整的豆种分别用75%乙醇, 0.1% HgCl₂ (含0.06N HCl) 进行表面消毒, 并用无菌水漂洗干净, 然后放置在内有数层湿润滤纸的无菌培养皿中27℃避光培养。40h 后挑选根尖穿破种皮的种子转移到大试管中。无菌大试管内侧含有圆筒状厚滤纸, 使种子夹在管壁与厚滤纸之间, 根尖朝下。管底贮有少量无菌水。继续避光27℃恒温培养3天。

豆芽转移到水培瓶中, 此时根据需要接入20ml生长在YEM培养液中的菌液(实验组)或无菌水(空白组)。水培瓶内植株培养液含(%): CaSO₄·2H₂O 0.046, MgSO₄·7H₂O 0.006, 柠檬酸高铁0.0075, K₂HPO₄·3H₂O 0.0136, KCl 0.0075, Ca(NO₃)₂ 0.003 和微量元素(%): H₃BO₃ 0.286×10⁻³, MnSO₄ 0.181×10⁻³, ZnSO₄ 0.022×10⁻³, CuSO₄ 0.08×10⁻³, H₂MoO₄ 0.002×10⁻³ [6]。植株培养房恒温在25℃左右, 相对湿度保持在60—80%, 每天日光灯照射12h。

在上述条件下培养, 观察结瘤情况待28—35天后取鲜瘤测定固氮酶活力, 按文献[7]所述原理, 10—200mg鲜瘤装入6ml

体积密封小瓶内, 注入1/10 (V/V) 乙炔, 30℃水浴保温1h, 抽取50—100μl, 反应后气体在气相色谱仪(102G型)上测定乙烯和乙炔的峰高。根据峰高比推算固氮酶活力 [8]。

(四) 巨型质粒的抽提及电泳鉴定

参照F.F.White的方法 [9], 结合F. Casse的溶菌步骤 [10] 和J.Hansen的分离程序 [11], 并稍作改动。

种子菌液以5%接种于100ml YEM中培养24h。离心收集的菌体用0.5M NaCl+TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mMEDTA) 及TE各洗一次。向含1ml TE悬浮菌体的离心管中加入25ml溶菌缓冲液 (50mM Tris pH 12.4, 20mM EDTA, 1% W/V SDS) 37℃保温30min。沿管壁滴加2M Tris-HCl pH7.0 溶液1.5ml, 缓缓摇动 (16rpm, 以下同) 8次。加3.6ml 25% W/V SDS (用TE缓冲液配), 缓缓摇动8次后迅速加入7.0ml 5M NaCl, 缓缓摇动20次。置冰浴4h后用Sorvall ss34转头在3℃, 14000rpm离心40min。取出上清液, 慢慢加入50% PEG 6000, 使之最终浓度达10%。缓缓摇动, 直至均一。4℃冰箱放置过夜。然后低速 (1500g) 离心10min 收集沉淀, 溶解在200μl TES (50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM NaCl, 5mM EDTA) 中。

上述样品50μl用作电泳鉴定。采用0.7%琼脂糖, TBE (89mM Tris, 89mM 硼酸, 2mMEDTA pH8.3) 为电泳缓冲液。在10℃, 场强为2V/cm下电泳15h。溴乙锭 (EB) (0.5μg/ml) 染色45min后在短波2537 Å紫外灯下观察, 拍照。

(五) Southern杂交

基本按标准步骤 [12] 操作。用 Nick traslation 标记的质粒 pSA30 (F. Cannon 提供) 作为探针 (放射比度为 5—9×10⁶

cpm/ μg DNA。所需DNase I和DNA聚合酶分别购于Sigma Boehringer Mannheim公司。

电泳胶经短波紫外照射15min后,经碱变性,中和后转移到硝酸纤维素膜(Schleicher & Schill GmbH D-3354 Dassel W, Germany)上。80°C真空干燥2h。

杂交在67°C下进行24h。洗膜先用2 \times SSC, 0.5%SDS在室温下洗两次(每次5min),然后用1 \times SSC, 0.1%SDS在62°C下洗两次(每次30min)。压片时间根据

需要为2—15天。

结果与讨论

(一) 结瘤实验及固氮酶活力测定

用我们分离,多次纯化的菌株经扩增大豆感染不同品系的大豆豆芽,10—14天就开始显瘤,无菌感染的植株(空白组)则不结瘤。收集28—35天的鲜瘤用气相色谱测定其乙炔还原成乙烯的能力,结果表明都有固氮酶活力(见表1)。从回接的根瘤中再次分离纯化菌株,第二次感染植株,

表 1 部分根瘤菌的固氮酶活力

Table 1 Nitrogenase activity in some strains of *R. japonicum*

菌 株 Strains	豆 种 Seeds	乙 烯 峰 C_2H_4 peak (mm)	乙 炔 峰 C_2H_2 peak (mm)	峰 高 比 Ratio of $\text{C}_2\text{H}_4/\text{C}_2\text{H}_2$	鲜 瘤 重 Fresh nodules weight (mg)	产 乙 炔 量 C_2H_4 produc- tion(ml/g-h)
78-17-3	春 78-17	560	3500	0.1600	63.8	0.5266
	74-52	620	5200	0.1190	72.0	0.3478
78-17-4	78-17	155	4000	0.0388	53.0	0.1535
	74-52	485	4500	0.1070	56.9	0.3978
78-17-7	黑农 -26	510	5100	0.1000	17.3	0.1790
	春 78-17	190	4900	0.0388	32.3	0.2521
78-17-8	74-52	130	4800	0.0271	64.1	0.0887
	黑农 -26	490	5000	0.1021	64.0	0.3350
78-17-8	74-52	150	5350	0.0280	22.8	0.2582
	黑农 -26	225	5000	0.0450	59.6	0.1586
191*	74-52	50	5000	0.1000	10.8	0.1940
	黑农 -26	65	5000	0.0130	10.5	0.2600

*表1中191即为美国USDA191, USDA193在我们所用的豆种中均未结瘤故未列出

In table 1., 191 represents USDA 191, USDA 193 can not form nodules in the seeds used in our experiment

结果与第一次相重复。这证明分离纯化的菌株确实是能与大豆共生固氮的根瘤菌。

值得注意的是,不同菌株在同一品系植株中和同一菌株在不同品系植株中的共生固氮能力都不同(表1)。因此,固氮能力与菌株,植物两方面均有关。美国USDA 191及193寄主专一性较高,在我们所用豆种中或结瘤甚少或不结瘤,固氮能力也较低,在74—52豆种上,菌株78-17-3和78-17-4比USDA191的固氮活力高出一

倍。

另外,虽然采用水培法操作简便,观察容易,但我们发现普遍结瘤量不高,生长28天时,每株植物含瘤量大多不到100mg。而且,即使是同一菌株对同一豆种植株,结瘤量的起伏也较大。

(二) 根瘤菌的一些物理性状

我们分离得到的菌株,革兰氏染色呈阴性,生长速率为3—4h/代,在YEM培养液中产酸(约降低1个pH值),与快

表 2 巨型质粒的数量分布
Table 2 Distribution of megaplasmids

菌株 Strains	含质粒数 Plasmids involved	菌株 Strains	含质粒数 Plasmids involved	菌株 Strains	含质粒数 Plasmids involved
78-17-3	pSRja783 ^a _b	D-3	pSRjad3 ^a _b	131	pSRja131 ^a _b
78-17-4	pSRja784 ^a _b	D-4	pSRjad4 ^a	B571	pSRja571 ^a _b
78-17-5	pSRja785 ^a	D-5	pSRjad5 ^a	B531	pSRja531 ^a _b
78-17-6	pSRja786 ^a _b	D-6	pSRjad6 ^a	B471	pSRja471 ^a _b
78-17-7	pSRja787 ^a _b	D-7	pSRjad7 ^a _b _c	B4010	pSRja4010 ^a _b
78-17-8	pSRja788 ^a _b	752	pSRja752 ^a _b	B151	pSRja15 ^a _b
78-17-9	pSRja789 ^a	B421	pSRja421 ^a _b	C531	pSRja53 ^a _b
78-17-10	pSRja7810 ^a	D151	pSRja151 ^a _b	692	pSRja692 ^a
D-2	pSRjad2 ^a _b	A251	pSRja251 ^a _b _c	121	pSRja121 ^a

表 2 中 pSRja 表示巨型质粒, 其后的数字表示从不同田野里获得的菌株; a, b, c, 表示固氮菌株的不同巨型质粒, 它们的分子量大小依次为 a > b > c

In table 2, pSRja represents megaplasmids, the following number represents strains obtained from different fields. a, b, c, represent different megaplasmids in the strains, the molecular weights increased from a to c

生型的 *R. melilotii*, *R. leguminosarum* 类同。

(三) 巨型质粒的抽提及其在根瘤菌中的分布

我们曾参照 C. I. Kado^[13] 和 M. M. Yelton^[14] 的方法抽提巨型质粒, 都失败了。对 F. F. White^[9] 的方法作了些改进使我们获得成功。根瘤菌胞外一层多糖类物质在与豆科植物发生共生关系中起重要作用^[15], 但在抽提巨型质粒时, 它会阻碍溶菌^[10]。所以, 破碎前用盐溶液 (0.5M NaCl + TE) 激烈振荡, 洗涤菌体表面是十分有益的。事实也表明是有效的。由于巨型质粒分子量很大, 剪切可能是抽提中的主要损失因素, 因此我们在操作中特别

小心, 摇动速度不超过 16 次/min。

筛选的数十株菌株的质粒分布情况见表 2。从表 2 中可见, 所有被筛选的快生型大豆根瘤菌都含 1—3 个巨型质粒。以 USDA 191 质粒分子量的分布为准, 估计这些巨型质粒的分子量范围在 30—250Md 之间。

(四) 与固氮酶结构基因杂交

先前 F. Cannon 等把肺炎克氏杆菌的 nif HDK (固氮酶结构基因) 及一部分 nif E.Y 基因克隆到载体 pACYC 184 中得到 pSA30^[16]。已研究过的所有固氮菌株的 nif HDK DNA 顺序都有很高的保守性^[17]。我们对抽提得到的巨型质粒, 利用 pSA30 作为探针, 与其中若干个菌株进

行了Southern杂交。结果见图版 I。表 3 列出了杂交菌株的巨型质粒,都杂交在最大一个(即巨型质粒 a)上。它的大小在各个菌株中近乎一样。

从图上可见,菌株 D151和78-17-7虽包含有巨型质粒,但没有杂交条带。多次实验均得到重复的结果。由于我们使用相同方法多次抽提巨型质粒而获得的结果是相同的。质粒失落的可能性很小,因此认为菌株D151和78-17-7的固氮酶结构基因不在巨型质粒上。快、慢生型的 *R. japonicum* 虽都含巨型质粒,但nif HDK基因一般位于快生型巨型质粒上,而慢生型的巨型质粒不包含固氮酶结构基因^[18]。D151 78-17-7的nif HDK基因不在巨型质粒上(参阅图版照片和表 3),情况类似于慢生型,这是一个非常有趣的现象。最近,Robert.V等也曾提及类似的现象^[19]。

采用Banfalvi,Z的洗膜条件^[4](2×SSC,室温),我们曾在含 3 个和 2 个巨型质粒的 A251、B421 菌株中都同时得到 2 个巨型质粒的杂交带。由于 A251 菌株中还有一条巨型质粒带未杂交,因此不能

表 3 nif HDK在部分菌株巨型质粒上的基因定位
Table 3 Localization of nif HDK gene in the megaplasmids of some *R. japonicum*

菌株 Strains	含质粒数 plasmids involved	nif HDK基因在质粒上的定位 Location of nif HDK gene in the plasmids
D-7	pSRjad7	a +
		b -
		c -
B421	pSRja421	a +
		b -
D151	pSRja151	a -
		b -
A251	pSRja251	a +
		b -
		c -
D-2	pSRjad2	a +
		b -
B151	pSRja15	a +
		b -

表3中“+”表示pSA30与巨型质粒能杂交,“-”表示没有杂交(参阅图版照片)

In table 3, “+” indicates that radioactive probe pSA30 can be hybridized with megaplasmids, “-” no hybridization

认为这两条杂交带是非特异性的。是否在这些菌株中nif HDK或其它部分基因是分布在二个巨型质粒上,还有待于进一步鉴定。

参 考 文 献

- [1] Keyser, H.H. et al., *Science*, 215:1631-1632, 1980.
- [2] Nuti, M.P. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 100: 241-248, 1977.
- [3] Hirsch, P.R. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 120: 403-412, 1980.
- [4] Banfalvi, Z. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 187: 166-171, 1981.
- [5] Vincent, J.M., *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*, IBP Handbook No. 15, Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- [6] 周平贞等, 中国油料, 1979年第2期.
- [7] Hardy, R.W.F. et al., *Plant Physiol.*, 43: 1185-1207, 1968.
- [8] 上海植物生理研究所固氮研究室, 植物学报, 16(4):382-384, 1974.
- [9] White, F.F. et al., *J. Bacteriol.*, 14: 1134-1141, 1980.
- [10] Casse, F. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 113:229-242, 1979.
- [11] Hansen, J.B. et al., *J. Bacteriol.*, 135:227-238, 1978.
- [12] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, by Cold Spring Harbor Laboratory Printed in the United States of America Book and cover design by Emily Harste, 1982.
- [13] Kado, C.I. et al., *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373, 1981.

- [14] Yelton, M.M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129: 1537—1547, 1983.
[15] Lim, S.T. et al., *FEMS Microbiology Letters*, 22: 53—56, 1983.
[16] Cannon, F.C. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 174: 59—66, 1979.
[17] Ruvkun, G.B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 191—195, 1980.
[18] Robert, V.M. et al., *J. Bacteriol.*, 152: 928—931, 1982.
[19] Robert, V.M. et al., *J. Bacteriol.*, 163: 21—26, 1985.

LOCALIZATION OF NITROGENASE GENE IN THE FAST GROWING *RHIZOBIUM JAPONICUM*

Ding Xiaohua Fu Yue Ye Shengyu Hong Guofan

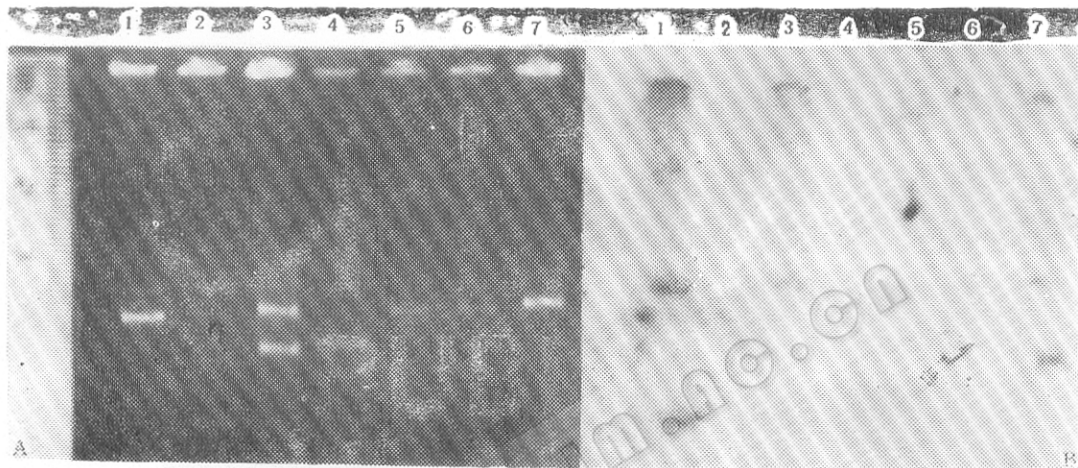
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Fast growing *Rhizobium japonicum*, the symbiotic nitrogen fixing bacteria, were isolated in the suburbs of Shanghai. They have shown quite different activity in the reduction of acetylene with varied degree of host specificity. All the bacteria contained megaplasmid (s). The megaplasmids were hybridized against pSA30, the nitrogenase gene containing plasmid. It was found that in some strains the nitrogenase gene was only located on the largest megaplasmids, but that in others the plasmids contained no nitrogenase gene. It was also found that in two strains pSA30 could be hybridized with more than one megaplasmids suggesting that the nitrogenase gene may be multicopied and distributed among them.

Key words

Fast growing *Rhizobium japonicum*; megaplasmid; nitrogenase; nitrogenase gene

Ding Xiaohua et al.: Localization of nitrogenase gene in the fast growing *Rhizobium japonicum*



- A. 巨型质粒在 0.7% Agarose 胶中的分布, 1—7 分别表示菌株 B421, D151, A251, 78-17-7, 725, D7 和 D2
- B. *nif HDK* 在巨型质粒上的杂交, 1—7 是相应于 A 的 1—7, 用 pSA30 为探针针对巨型质粒杂交以确定固氮酶基因的定位, B 中 1, 3, 5, 6 和 7 表明该基因定位于巨型质粒上, 而 2 和 4 未见杂交带
- A. Electrophoresis of megaplasmids on 0.7% agarose gel, 1—7 indicate the lanes which show the distribution patterns of the megaplasmids harboured in strain B421, D151, A251, 78-17-7, 725, D7 and D2 respectively
- B. Autoradiograph of hybridized megaplasmid, 1—7 show the corresponding position A 1—7 respectively