

紫云英根瘤菌基因文库的构建及含完整结瘤 基因的重组质粒pRaZ15的分离

张忠明 陈华癸 李阜棣

(华中农业大学生物固氮研究室, 武汉)

范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室, 北京)

以紫云英根瘤菌菌株7653R为材料, 制备总DNA, 经EcoRI 限制酶部分酶解, 通过10—50%蔗糖梯度离心, 分离到20—30 kb 的DNA片段。利用能在革兰氏阴性菌中转移和复制的广谱寄主载体——pLAFR1质粒, 构建了紫云英根瘤菌基因文库。通过与苜蓿根瘤菌1021菌株中8.7kb的共同结瘤基因(作探针DNA)杂交, 从基因文库中分离到紫云英根瘤菌共同结瘤基因片段。以紫云英根瘤菌不结瘤突变株 7653R + 1 (7653R 消除共生质粒) 为受体、构建的7653R 基因文库(*E. coli* C600) 为供体, 通过协助转移质粒pRK2013(LE392)进行三亲交配, 在含四环素的根瘤菌合成培养基(SM)上选择接合转移子。将得到的所有接合转移子混合在一起接种植物, 通过植物结瘤试验, 分离到含紫云英根瘤菌结瘤基因的重组质粒pRaZ15。将该质粒用 EcoRI 完全酶切, 得到 35kb 左右的外源 DNA 片段, 该片段携带完整的结瘤基因簇。

关键词 紫云英根瘤菌; 结瘤基因; 基因文库

紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 是我国南方水稻田里的主要豆科绿肥, 对增加粮食产量、保持土壤肥力起着重要作用。陈华癸^[1,2]、范云六^[3] 等对紫云英根瘤菌进行过许多研究。

近年来的遗传学研究表明, 紫云英根瘤菌和其它一些快生型根瘤菌一样, 也广泛存在着内生大质粒^[4,5], 其共生基因也存在于特定的大质粒上^[6,7]。迄今为止, 尚未见到关于紫云英根瘤菌完整结瘤基因簇的分离和克隆的报道。本文利用能在革兰氏阴性菌中转移和复制的广谱寄主载体——pLAFR1^[8] 构建了紫云英根瘤菌 7653R 菌株的总 DNA 基因文库, 并通过与苜蓿根瘤菌 8.7kb-EcoRI 片段的共同结瘤基因杂交, 从基因文库中分离出含有紫云英根瘤菌共同结瘤基因片段。同

时利用不结瘤(Nod⁻)突变株 7653R + 1, 进行三亲交配, 用接合转移子接种紫云英植株, 从7653R基因文库中分离出具有完整功能的紫云英根瘤菌结瘤基因簇。

材料与方 法

(一)材料

1. 细菌和质粒: 见表 1。

2. 培养基

(1) TY 培养基(g): 胰蛋白胨 5, 酵母粉 5, CaCl₂·6H₂O 1.3, 蒸馏水 1000ml, pH7.0。

本文于1989年10月6日收到。

国家自然科学基金资助的课题。

本文部分工作是在中国农科院分子生物学研究室完成, 并得到该室杜杰、刘阳、王宪等同志的大力支持和帮助, 在此表示感谢。

表 1 细菌和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株与质粒 Strains & plasmids	有 关 性 状 Relevant characteristics	文献及来源 Reference or source
<i>R. astragali</i>		
7653R	Nod ⁺ Fix ⁺ (wild type)	{ 7 }
7653R + 1	Nod ⁻ mutant of 7653R devoid of Sym-plasmid	{ 7 }
R15	Nod ⁺ (7653R + 1 contained recombinant plasmid pRaZ15)	This work
<i>E. coli</i>		
LE392	F ⁻ hedk514 (rk ⁻ mk ⁻) sup44, SupF58, LacY1 or Δ(LacIZY)6 galK2, galT22, matB1, trpR65 λ ⁻	中国农科院分子生物学研究室 Lab. Mol. Biology, Chinese Acad. Agri. Sci.
C600	F ⁻ thx-1, thi-1, LeuB6, LacY1, tonA21, supE44, λ ⁻	
BHB2688	N205, recA ⁻ (λimm434, cIts', b2, red3, Eam4, Sam7)λ	
BHB2690	N205, recA ⁻ (λimm434, cIts', b2, red3, Dam15, Sam7)λ	
<i>R. leguminosarum</i>		
T83K3	Nod ⁺ Fix ⁺ km ^r	Johnston(1978)
Plasmids		
pLAFR1(HB101)	cosmid derivative of pRK290, Tc ^r	{ 8 }
pRmSL26(HB101)	<i>R. meliloti</i> nod gene cloned in pLAFR1	{ 14 }
pBR325(HB101)	Amp ^r , Tc ^r , Cm ^r	This Lab.
pRmZ1(HB101)	<i>R. meliloti</i> 8.7Kb common nod gene cloned in pBR325	This work
pRa370(C600)	<i>R. astragali</i> common nod gene cloned in pLAFR1	This work
pRaZ15(HB101)	<i>R. astragali</i> nod gene cluster cloned in pLAFR1	This work
pRK2013(LE392)	tra ⁺ ColE1	Ditta, et al.(1980)

(2) TA 培养基(g): 胰蛋白胨 4, MgSO₄ · 7H₂O 0.6, 蒸馏水 1000 ml pH7.2.

(3) SM 培养基: 蔗糖 10g, KNO₃ 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, CaCl₂ 0.1g, NaCl 0.1g, H₃BO₃ 20mg, Na₂MoO₄ 20mg, 硫酸素 0.1mg, 烟酰胺 0.1mg, 泛酸钙 0.1mg, 生物素 1mg, 蒸馏水 1000ml, pH7.0.

(二) 方 法

1. DNA 的分离及操作: 根瘤菌总 DNA 的分离方法参考 Ma, Q.S. 等^[9]的方法。提取的总 DNA 经 EcoRI 部分酶解后, 经 10—50% 蔗糖梯度, 25000 rpm (Beckman SW28) 20℃ 离心 24h, 然后收集 20—30kb 的 DNA 片段, 装入透析袋内, 在 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.8) 中透析 24h,

每隔 6h 换一次缓冲液, 取出样品, 加入 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钾 (pH8.0), 加入 2 倍体积的 -20℃ 冷却的无水乙醇, 置 -20℃ 过夜。离心 (15000 rpm, 4℃, 20min) 沉淀 DNA, 加入 70% 冷乙醇洗涤一次, 以同样的条件离心再沉淀 DNA, 最后 DNA 悬浮于 200μl 的 TE 缓冲液中。

载体 DNA (pLAFR1) 的制备以及重组质粒 DNA 的检测按 Maniatis 等^[10]的碱性裂解法进行。

DNA 的连接采用 T4DNA 连接酶 (日本 Zeon 公司) 在 12℃ 连接 16h。

2. λ 噬菌体包装物的制备及效价测定: 包装物的制备参照 Puhler, A.^[11]的方法。效价测定指示菌的制备参照 Boehringer Mannheim 公司产品目录上介绍的方法^[12], 指示菌为 LE392。

3. 重组 DNA 的体外包装及转染:

重组DNA的体外包装及转染按 Puhler, A.^[11]的方法进行,重组子在含四环素(15 μ g/ml)的LB选择性培养基上筛选,受体菌为C600。

4. 缺口转译及菌落原位杂交:缺口转译药盒为BRL公司产品, α -³²P-dCTP为Dupont公司产品,被标记的质粒pRmZ1 DNA为碱解法制备物,反应条件按BRL公司缺口转移药盒的说明进行。

菌落原位杂交:硝酸纤维素膜(Serva公司)的制备处理按Maniatis等^[10]的方法进行。膜杂交按下述方法进行:膜在杂交前,用50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 1mmol/L EDTA, 1mol/L NaCl在42 $^{\circ}$ C处理30min,然后置于滤纸上吸干,按0.2ml/cm²膜的量加入预杂交液(1:1甲酰胺, 5 \times SSPE, 0.3% SDS, 0.1mg/ml热变性的鲑精DNA), 42 $^{\circ}$ C预杂交2.5h,倒去预杂交液,再按1/4原体积的量加入杂交液,热封口,置42 $^{\circ}$ C水浴中杂交24h。然后取出膜置于42 $^{\circ}$ C预热的0.5% SDS、2 \times SSC中漂洗30min,再转入42 $^{\circ}$ C预热的0.1% SDS、2 \times SSC中漂洗30min。膜放在滤纸上晾干,并置于X-光暗匣中,压上X-光片,在-20 $^{\circ}$ C曝光24h。

5. 三亲交配及植物结瘤试验:取已转染的大肠杆菌0.5ml(40%甘油保存)接种于5ml含四环素(15 μ g/ml)的LB培养液中,37 $^{\circ}$ C振荡培养12h。同时接种含质粒pRK2013的菌株于5ml含卡那霉素(50 μ g/ml)的LB培养液中,37 $^{\circ}$ C培养12h。紫云英根瘤菌不结瘤突变株7653R+1接种于5ml TY培养液中,28 $^{\circ}$ C振荡培养24—36h。将三个培养好的菌株等比例混合后,用无菌注射器注射到醋酸纤维素滤膜上(ϕ 25mm,孔径为0.2 μ m),然后将膜置于已制备好的TY固体培养基上,28 $^{\circ}$ C

培养16—24h,用无菌水洗下菌苔,所洗下的菌悬液全部涂布到含四环素(10 μ g/ml)的SM培养基上。0.2ml/皿,用7653R的基因文库和7653R+1同时涂皿作对照,28 $^{\circ}$ C培养3—5天后,长出的菌落用无菌水全部洗下,混合起来制成菌悬液,作为接种物进行植物结瘤试验。

紫云英种子经表面灭菌和催芽后,插入无氮植物营养液配制的琼脂栽培管中,置25 $^{\circ}$ C光照室生长2天后,将上述制得的菌悬液接种于琼脂栽培管中,0.5—1ml/每管,植物继续在光照室生长30—40天后观察结果。

结果与讨论

(一)紫云英根瘤菌基因文库的构建

紫云英根瘤菌7653R菌株的总DNA用EcoRI部分酶解后,通过蔗糖梯度离心,得到20—30kb的DNA片段,将这种DNA片段连接到经EcoRI酶切的pLAFR1质粒上,参照Friedman的方法^[8],连接时外源DNA与载体DNA的比例约为8:1,即根瘤菌DNA为400 μ g/ml,载体DNA为50 μ g/ml。高浓度的外源DNA可以降低载体DNA自身连接的比例,酶连结果见图版I-A。这种连接物经体外包装并转染*E. coli* C600,在含四环素(15 μ g/ml)的LB培养基上筛选四环素抗性克隆,结果见图1。四环素抗性克隆数的得率为 $7.4 \times 10^4/\mu$ g DNA连接物。

为了检测四环素抗性克隆中载体-外源DNA连接和载体自身连接的比例,我们随机挑取了50株四环素抗性克隆分离质粒作为初检,结果表明50株中有15株含有载体与外源DNA连接的重组质粒,其余均为载体自连的pLAFR1质粒。结果见图版I-B。图版I-B是50株四环素抗性克

隆质粒检测中的部分结果(5块电泳凝胶中的1块),从图版I-B可以看出,3,4,6,7,8号样品的质粒带型与1号样品(载体 pLAFR1 质粒)完全一样,而5,9,10,11,12号样品带型与1号样品不一样,所以我们初步认为后者不一样的是重组质粒,即在pLAFR1上克隆有外源DNA片段。值得说明的是,本文采用的是碱性裂解法抽提质粒,而pLAFR1质粒及克隆有外源DNA片段的重组质粒都含有“cos”位点,“cos”位点在碱性条件下很容易连在一起,使质粒形成多聚体。从图版I-B可以看出除2号样品(无质粒对照菌株C600)外,其余样品在染色体带以上均隐约可见多聚体带,根据pLAFR1的单体质粒带以及多聚体带的位置,我们初步确定3,4,6,7,8样品的质粒为载体自连的结果,其它均为重组质粒。通过这种判断方法,在上述50株中有15株是重组质粒。为了进一步确证这15株是否克隆有外源DNA片段。我们从15株中随机取6株制备质粒DNA,用EcoRI完全酶切。并将这6株不同的质粒分别命名为pRa1、pRa2、pRa3、pRa4、pRa5、pRa6。酶切分析结果见图版I-C。结果表明这6个质粒均含有外源DNA片段,而且不同的质粒克隆的外源DNA片段都不相同,说明克隆有多种多样的外源DNA片段。其外源DNA片段的大小在18.8—29.8kb范围之间。因此,重组克隆的质粒在基因文库中的比例约为30%。根据Maniatis等^[10]介绍的公式: $N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f/g)}$, 根瘤菌基因组DNA为 1×10^7 bp(g), 插入片段以 2.5×10^4 bp(f)计算,构建基因文库能以99%的概率(P)覆盖根瘤菌整个DNA,理论上需要的重组子数(N)可以通过上式计算为 1.8×10^3 。

本文所得基因文库的重组子数达到理论值,满足了建库的要求。

(二) 紫云英根瘤菌共同结瘤基因的分离

将根瘤菌基因文库中分离出的2000个菌落复印到硝酸纤维素膜上(膜处理及杂交见材料和方法),从pRmSL26质粒上切下含有苜蓿根瘤菌8.7kb的共同结瘤基因

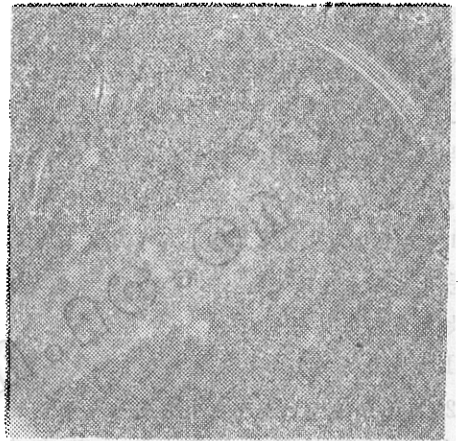


图1 四环素抗性克隆的筛选
Fig.1 Selection of tetracycline resistance clones

培养基为含四环素(15μg/ml)的LB培养基
LB medium containing tetracycline (15μg/ml)

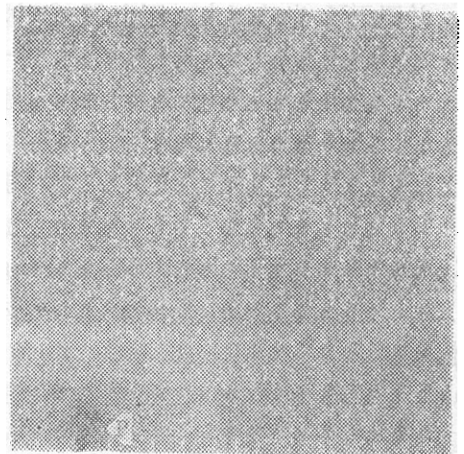


图2 菌落原位杂交结果
Fig.2 The result of colony hybridization
P. (pRa370); C. (pRmSL26) used as positive control, pRmZ1 used as a probe

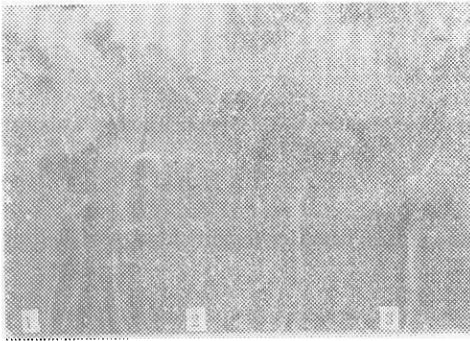


图3 紫云英植物结瘤试验结果

Fig.3 The result of nodulation tesse on *A. sinicus*

1. Inoculated with 7653R strain (positive control)
2. Inoculated with 7653R+1 strain (negative control)
3. Inoculated with mixture of triparental mating transconjugants (7653R gene library, pRK2013 and 7653R+1)

片段,克隆到pBR325的EcoRI位点上,构成pRmZ1质粒,pRmZ1的酶切分析见图版I-D。将该质粒作为探针DNA,从上述菌落中分离到含紫云英根瘤菌共同结瘤基因片段的重组质粒,定名为pRa370,菌落原位杂交结果见图2。pRa370质粒经EcoRI完全酶切得到2条外源DNA片段,其分子量大小分别为6kb和3kb(结果见图版I-E)。

(三)用互补Nod⁻突变体功能的试验分离紫云英根瘤菌结瘤基因簇

以紫云英根瘤菌不结瘤突变株(Nod⁻)7653R+1(消除了共生质粒)为受体,紫云英根瘤菌7653R基因文库(C600)为供体,以pRK2013(LE392)为协助转移质粒,进行三亲交配后得到的所有接合转

移子,用无菌水洗下并混合在一起接种紫云英植株。在无氮植物营养液紫云英琼脂栽培管中,100管有9管结瘤,7653R正对照有4/5管结瘤,7653R+1负对照5管都不结瘤(结果见图3)。从接合转移子所结的根瘤中分离并纯化根瘤菌,检测该根瘤菌是否具有四环素抗性。实验结果表明,分离的菌株都具有四环素抗性。按Hirsch^[13]的方法分离质粒并作电泳检测,表明从瘤中分离出的根瘤菌增加了一个50kb左右的质粒,该质粒定名为pRaZ15(图版I-F),含该质粒的根瘤菌定名为R15。在图版I-F中的1号样品,其pRaZ15质粒也呈现多条带现象,我们认为也是由于碱解法引起的质粒多聚体。这种多聚体不影响转化和酶切,酶切后多聚体完全消失。我们将pRaZ15质粒的抽提物转化*E. coli* HB101,在含四环素的LB培养基(15μg/ml)上筛选转化子,然后从转化子中分离,制备质粒DNA,用EcoRI进行完全酶切。结果表明重组质粒pRaZ15除含有载体pLAFR1质粒DNA带(21.6kb)外,还含有7条外源DNA酶切带,累计外源DNA片段的分子量约为25kb(结果见图版I-G)。通过进一步的植物试验证明,该片段具有恢复紫云英根瘤菌不结瘤突变株7653R+1在紫云英植株上的结瘤功能。7653R+1是一株消除了共生质粒的突变株,因此试验表明该片段含有完整功能的结瘤基因簇(或7653R+1原丢失的共生质粒上的结瘤基因簇)。

参 考 文 献

- [1] Chen, H. K. et al.: *Soil. Sci.*, 51:291--293, 1944.
- [2] 陈华癸:新科学,3:33-38,1952.
- [3] 范云六:土壤通讯,3:44-45,1965.
- [4] 张忠明等:华中农业大学学报,5(4):326-331,1986.
- [5] 王常霖等:华中农业大学学报,7(1):15-21,1988.

- [6] 宁林夫等: 遗传学报, 13(1):1—10, 1986.
[7] 周俊初等: 华中农业大学学报, 6(2):156—164, 1987.
[8] Friedman, A. M. et al.: *Gene*, 18:289—296, 1982.
[9] Ma, Q. S. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 187:166—171, 1982.
[10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
[11] Puhler, A. et al.: *Advance Molecular Genetics*, Sperring-Verlag Berlin Heidelberg, pp.190—201, 1984.
[12] Boehringer, M.: *Biochemicals for Molecular Biology*, Eds:Boehringer Mannheim GmbH-Biochemica, Printed in Wester Germany, p.12, 1987.
[13] Hirsch, P. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 120:403—412, 1980.
[14] Long, S. R. et al.: *Nature*, 298:485—488, 1982.

Construction of Gene Library and Isolation of pRaZ15 Containing Complete Nodulation Genes in *Rhizobium astragali*

Zhang Zhongming Chen Huakui Li Fudi

(Laboratory of Biological Nitrogen Fixation, Huazhong Agricultural University, Wu Han)

Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Total DNA partially digested by EcoRI was prepared from *Rhizobium astragali* strain 7653R, from which 20—30kb DNA fragments were collected from sucrose-gradient (10—50%) centrifugation. Gene library of *Rhizobium astragali* was constructed with cosmid pLAFR1. Common nod genes were identified by DNA hybridization with a 8.7kb nod fragment of *R. meliloti* 1021. Tri-parental mating experiments were conducted with recipient strain 7653R+1 (Nod mutant of 7653R devoid of sym plasmid), donor stain 7653R gene library and helper strain LE392 (pRK2013). Hybrids were grown on SM containing tetracycline (10 μ g/ml), mixed and then used as inoculate for plant nodulation test on *A. sinicus*. Nodules were formed. Symbiotic bacteria were isolated (pRaZ15) containing complete set of nod genes. pRaZ15 was digested completely by EcoRI, 25kb DNA inserts on pLAFR1 were obtained.

Key words

Rhizobium astragali, nod genes, gene library

图 版 说 明

Explanation of Plate I

A. 酶连结果 Identification of ligation

1. Foreign DNA fragments (20—30kb),
2. Ligates of EcoRI-digested pLAFRI and foreign DNA,
3. λ DNA (~50kb),
4. EcoRI-digested pLAFRI DNA (21.6kb).

B. 四环素抗性克隆质粒检测的电泳图谱

Electrophoretogram of detected plasmid of tetracycline resistance clones

1. Vector pLAFRI plasmid;
2. Recipient strain C600;
- 3—12. Plasmid of tetracycline resistance clones.

C. 六株不同重组子DNA的酶切鉴定

Identification of EcoRI digested patterns of 6 different recombinants

1. pRa1/EcoRI DNA fragments;
2. pRa2/EcoRI DNA fragments;
3. pRa3/EcoRI DNA fragments;
4. pRa4/EcoRI DNA fragments;
5. pRa5/EcoRI DNA fragments;
6. pRa6/EcoRI DNA fragments;
7. pLAFRI/EcoRI DNA fragments;
8. λ DNA/EcoRI DNA molecular weight marker;
9. λ DNA

D. pRmZ1质粒的酶切鉴定

Identification of pRmZ1 plasmid digested with EcoRI

1. Vector pBR325/EcoRI DNA fragment;
2. pRmZ1/EcoRI DNA fragments;
3. λ DNA/Hind III DNA molecular weight marker

E. pRa370质粒的酶切鉴定

Identification of recombinant plasmid pRa370 DNA digested with EcoRI

1. EcoRI-digested vector pLAFRI DNA;
2. pRa370 plasmid DNA;
3. EcoRI-digested pRa370 DNA;
4. λ DNA/Hind III DNA molecular weight marker

F. 转移接合子中重组质粒的检测

Detection of recombinant plasmid in the transconjugant

1. transconjugant strain R15;
2. *Rhizobium leguminosarum* strain T83K3 (containing 3 megaplasms MW. 150, 200, 250kb);
3. recipient strain 7653R+1 (containing a megaplasmid 130kb)

G. 重组质粒pRaZ15的EcoRI酶切鉴定

Identification of recombinant plasmid pRaZ15 digested with EcoRI

1. λ DNA/EcoRI DNA fragments (MW. marker);
- 2,3. pRaZ15/EcoRI DNA fragments;
4. pLAFRI/EcoRI DNA fragment (21.6 kb).

Zhang Zhongming et al.: Construction of gene library and
isolation of pRaZ15 containing complete nodulation
genes in *Rhizobium astragali*

