

## 适用于细菌与植物互作研究的 *gusA* 启动子探针 载体 pHN112 的构建\*

史巧娟 马立新\*\* 蒋思婧\*\* 周俊初\*\*\*

(农业部农业微生物重点实验室 华中农业大学 武汉 430070)

**关键词**  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因(*gusA*), 质粒稳定性, 启动子探针载体, 菌植互作  
**分类号** Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0259-62

启动子探针载体是分离和比较启动子效率的合适工具,一般通过报告基因的表达来反映启动子存在的强弱。分离鉴定细菌侵染宿主植物的相关基因的启动子,有助于阐明菌植互作的分子机理。用于互作研究的启动子探针载体至少应具备以下基本条件:一是报告基因的表达不受细菌和宿主植物活性的背景干扰;二是载体系统在无选择压力条件下应能稳定复制。

$\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因(*gusA*)作为报告基因已广泛应用于植物分子生物学研究中,它编码的 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)在植物中没有背景干扰,而且有多种 GUS 底物适用于进行基因表达的定量分析和空间定位,尽管 *gusA* 基因分离自大肠杆菌,但 GUS 活性在大多数感染植物的细菌(如根瘤菌、农杆菌、黄单胞菌和固氮螺菌等)中并不存在。因而, *gusA* 基因作为微生物研究的报告基因具有广泛的应用前景<sup>[1,2]</sup>。质粒 pTR102 是含 *parCBA/DE* 的 miniRK2,在供试的所有革兰氏阴性细菌中均能稳定存在<sup>[3]</sup>。为此,本研究选择 *gusA* 为报告基因,以 pTR102 为载体来构建适用于菌植互作的启动子探针载体。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:见表 1。

1.1.2 培养基与培养条件:大肠杆菌用 LB 培养基<sup>[5]</sup>、于 37℃ 下培养。快生型大豆根瘤菌用 TY 或 SM 培养基<sup>[7]</sup>、于 28℃ 下培养。

1.1.3 酶和试剂:限制酶、T4DNA 连接酶等分别购自 Promega、Gibco/BRL 或 BioLabs 公司,4 种 dNTP 购自上海 Sangon 公司,X-gal 和 IPTG 购自 Sigma 公司,X-glcA 购自 Clontech 公司,氨苄青霉素(Amp)、四环素(Tc)和卡那霉素(Km)均购自 Sigma 公司。

1.1.4 质粒的分离和纯化:按文献[5]用碱法提取,PEG 纯化。

1.1.5 质粒 DNA 酶切、片段回收、连接与转化:质粒 DNA 酶切按厂家说明书进行,DNA 片段采用 Clontech 公司的 Advantage TM PCR-Pure 试剂盒回收,连接与转化均按文献[5]进行。

1.1.6 接合转移:采用三亲本滤膜杂交法进行<sup>[6]</sup>。

1.1.7 植物结瘤试验:采用水培法进行<sup>[7]</sup>。

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 863-101-03-03-07)。

\*\* 现在湖北大学生命科学院工作。

\*\*\* 联系作者。

收稿日期:1997-12-22,修回日期:1999-01-18。

表 1 供试菌株和质粒

菌株或质粒	相关性状	文献来源
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44, \Delta lacU169, hsdR17, recA1</i> <i>endA1, gryA966, thi-1, relA1</i>	本室保存
快生型大豆根瘤菌 ( <i>Sinorhizobium fredii</i> )		
HN01	Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	本室保存
质粒		
pCAM121	Ap <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> /Str <sup>R</sup> , 含有 <i>gusA</i> 表达单元的 mini Tn5	[2]
pIJ2925	derivative of pUC19, Ap <sup>R</sup>	本室保存
KS(+)	克隆载体, Ap <sup>R</sup>	本室保存
pTR102	广谱性稳定载体	[3]
pRK2013	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , <i>mob</i> <sup>+</sup> , <i>tra</i> <sup>-</sup> , <i>parCBA/DE</i>	
pHN107	协助质粒, <i>mob</i> <sup>-</sup> , <i>tra</i> <sup>+</sup> , Km <sup>R</sup>	[4]
pHN108	<i>gusA</i> cloned in pIJ2925	本研究
pHN109	<i>gusA</i> cloned in KS(+)	本研究
pHN110	<i>gusA</i> cloned in pTR102	本研究
pHN112	promoterless <i>gusA</i> cloned in KS(+)	本研究
	promoterless <i>gusA</i> cloned in pTR102	本研究

1.1.8 重组大豆根瘤菌营养生长条件下质粒的稳定性测定:见文献[7]。

1.1.9 GUS 活性测定:参照文献[2]进行。

## 2 结 果

### 2.1 *gusA* 基因标记载体 pHN109 的构建

用 *Hind*III 酶切质粒 pCAM121, 回收带有 *gusA* 表达单元的 2.3kb 片段, 插入 pIJ2925 的 *Hind*III 位点, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  后涂布 LB + X-gal + IPTG + Amp 平板, 挑白色菌落抽质粒 DNA, 用 *Eco*RI 酶切产生 2.7kb 和 2.3kb 两个片段的质粒是需要插入方向的重组质粒, 命名为 pHN107。将用 *Eco*RI 酶切 pHN107 产生的 2.3kb 片段插入到 KS(+ ) 的 *Eco*RI 位点, 连接产物转化 DH5 $\alpha$  并涂布 LB + X-gal + IPTG + Amp 平板, 挑白色菌落抽质粒 DNA 用 *Kpn*I 酶切产生 2.9kb 和 2.3kb 两个片段的质粒是需要插入方向的重组质粒, 命名为 pHN108。用 *Kpn*I 酶切 pHN108, 回收 2.3kb 片段, 插入到 pTR102 的 *Kpn*I 位点, 用连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 涂 LB + Tc 平板, 挑转化子提取质粒鉴定比 pTR102 泳动慢的质粒, 用 *Kpn*I 酶切有 2.3kb 和 10.5kb 两个片段者为所需的重组质粒, 定名为 pHN109。

用 pHN109 转化 DH5 $\alpha$ , 点接种到 LB + X-gal 平板上, 同时点接种 DH5 $\alpha$ (pTR102) 作为对照。培养 12 h 后, DH5 $\alpha$ (pHN109) 的转化子菌落变蓝, 而 DH5 $\alpha$ (pTR102) 菌落无色。本结果表明 pHN109 是需要的 *gusA* 基因标记载体。

### 2.2 广宿主、稳定性 *gusA* 启动子探针载体 pHN112 的构建

用 *Bgl* II 和 *Sma* I 双酶切 pHN108 以消除 *gusA* 所带的 *aph* I 启动子但保留 SD 序列和终止子部分<sup>[2]</sup>后用 Klenow 酶补平并自连, 将连接物转化 DH5 $\alpha$  后提取质粒, 筛选 *Bgl* II 和 *Sma* I 均切不开、*Kpn* I 可切出 6.0kb 一条带的质粒, 命名为 pHN110。回收用 *Xba*I 和 *Eco*RI 双酶切 pHN110 产生的 2.0kb 的片段, 和用同样双酶切的 pIJ2925 连接, 将连接物转化 DH5 $\alpha$  并涂布 LB + X-gal + IPTG + Amp

平板,挑白色菌落抽质粒 DNA,筛选用 *Bgl* II 单切或用 *Xba*I 和 *Eco*RI 双酶切均可产生 2.7kb 和 2.0kb 两个片段,而用 *Xba*I 或 *Eco*RI 单酶切只产生 4.7kb 一个片段的质粒并命名为 pHN111。将用 *Bgl* II 酶切产生的 2.0kb 片段插入到 pTR102 的 *Bam*HI 位点的连接物转化 DH5 $\alpha$  后涂布 LB+Tc 平板。选取长出的单菌落作质粒快检,挑选比 pTR102 泳动慢的质粒用 *Bam*HI 酶切并与也用 *Bam*HI 酶切的 pTR102 再次电泳比较,若依然泳动慢,不管插入方向,命名为 pHN112。

### 2.3 pHN112 启动子探针载体功能的验证

回收用 *Sau*3AI 酶切 pBR322 的 670bp 的具有双向启动子活性的片段<sup>[8]</sup>并插入到 pHN112 的 *Bam*HI 单一酶切位点,用连接物转化 DH5 $\alpha$  后涂 LB+ Amp 平板并挑 100 个转化子转接于 LB+ X-glcA + Amp 的平板上,37 $^{\circ}$ C 培养后有蓝色菌落出现(图 1)。挑蓝色菌落抽质粒并用 *Sau*3AI 酶切有 670bp 的带存在证明 pHN112 结构正确,并将带 670bp *Sau*3AI 片段的 pHN112 质粒命名为 pHN113(不管插入方向)。通过三亲本杂交将该质粒导入快生型大豆根瘤菌 HN01 中。将转移接合子挑到 TY+ X-glcA + Tc 平板上,长出的菌落均变蓝。

### 2.4 HN113 在 HN01 中的稳定性测定

在营养生长条件下将 HN01(pHN113)在 SM 培养基上连续转接 10 次后稀释涂 SM 平板,随机挑取单菌落转接 SM+ X-glcA 平板,长出的单菌落均为蓝色,而对照 HN01(pHN112)无色(图 2)。将 HN01(pHN113)接种大豆植株,盆栽 21d 后取根系进行 GUS 显色,结果见图 3。由图 3 可见:每一个根瘤都被染成蓝色。本结果证明 pHN113 不论是在营养生长还是在共生条件下均能在 HN01 中稳定遗传。

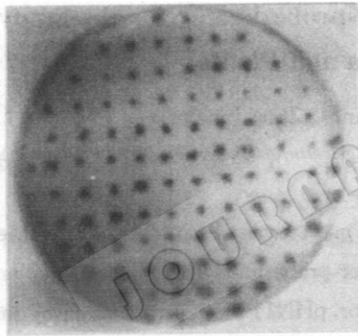


图 1 *gusA* 基因在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中的表达  
用 pHN113 转化 DH5 $\alpha$  在 LB + glcA + Amp 平板上形成蓝色的转化子

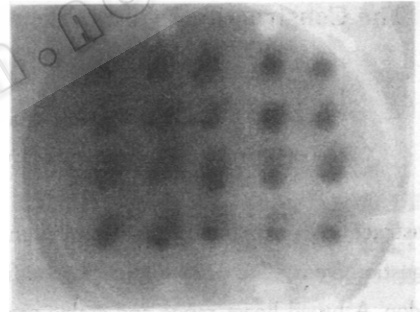


图 2 *gusA* 基因在快生型大豆根瘤菌 HN01 中的表达  
白色菌落为 HN01(pHN112), 蓝色菌落(图中深色)为 HN01(pHN113)

## 3 讨论

利用植物没有背景活性、并已广泛应用于细菌基因调控研究的 *gusA* 基因和广宿主、稳定性载体 pTR102 构建的启动子探针载体 pHN112 符合进行细菌与植物互作研究的要求。本研究快生型大豆根瘤菌的结瘤试验结果证明了这一推论。尽管 Wang 等人构建了用于菌植互作的广宿主范围启动子探针载体,但是他们所用的报告基因 *lacZ* 在野生型菌株和植物组织中都有背景活性,从而增加了结果分析的复杂性;而且该载体的稳定性较差<sup>[9]</sup>。因此本研究构建的启动子探针载体 pHN112 在菌植互作

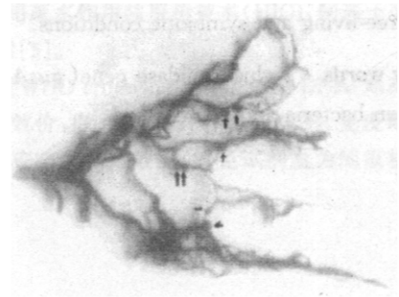


图 3 *gusA* 基因在共生根瘤中的表达  
接种有 HN01(pHN113)的大豆根系浸泡入 GUS 显色液中,37 $^{\circ}$ C 过夜,黑箭头示蓝色根瘤

研究中将有更广泛的应用前景。

pHN112 具有 *Bam*HI 的单克隆位点,其应用符合“鸟枪法”克隆启动子的需要,但难于克隆有不同酶切位点的启动子片段,因而有必要在 *Bam*HI 位点上再插入一个多克隆位点接头。此外, pHN112 可克隆转录融合的启动子,如要克隆翻译融合子,还须对 *gusA* 基因的 5' 端进行修饰,并引进适当的酶切位点。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] K. J. Wilson. *Soil. Biol. Biochem*, 1995, 27: 501~504.
- [ 2 ] K. J. Wilson, A. Settitch, J. C. Corbo *et al. Microbiol*, 1995, 141: 1691~1705.
- [ 3 ] M. Weinstein, R. C. Roberts, D. R. Helinski *J. Bacteriol*, 1992, 174: 7486~7489.
- [ 4 ] G. Ditta *et al. Proc. Nead. Sci. USA*, 1980, 77: 7347~7351.
- [ 5 ] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [ 6 ] A. M. Fgiedman *et al. Gene*, 1982, 18: 289~294.
- [ 7 ] 朱光富, 周俊初, 陈华癸. *遗传学报*, 1996, 23(2): 131~141.
- [ 8 ] G. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Greene *et al. Gene*, 1977, 2: 95.
- [ 9 ] Y. P. Wang, K. Birkenhead, B. Boesten *et al. Gene*, 1989, 85: 135~144.

## The Construction of a Stable *gusA* Promoter-probe Vector for the Study of Interaction Between Bacteria and Plants\*

Shi Qiaojuan Ma Lixin Jiang Sijing Zhou Junchu

(The Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract** An expression cassette of  $\beta$ -glucuronidase gene(*gusA*) was obtained by *Hind*III enzyme digestion from pCAM121 and then modified into a promoter-probe unit with SD sequence and stop codon. A broad-host-range and stable promoter-probe-vector, pHN112 was constructed by inserting above unit into pRT102. A recombinant plasmid, pHN113, was obtained by inserting a 670bp *Sau*3AI DNA fragment of pBR322 into *Bam*HI site of pHN112 and then introduced into *Sinorhizobium fredii* HN01 by tri-parent mating. The expression of *gusA* proved the correct structure of pHN112. The result of stability tests showed that the pHN113 could stably present in HN01 both in free-living and symbiotic conditions.

**Key words**  $\beta$ -glucuronidase gene(*gusA*), promoter-probe vector, plasmid stability, interaction between bacteria and plants

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 863-101-03-03-07).