

# 苜蓿中华根瘤菌 042B 共同结瘤基因 *nodABC* 的克隆与序列分析\*

杨兴洪 刘艳宁 杨苏声

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)

关键词 苜蓿中华根瘤菌, 共同结瘤基因, 序列分析

分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)03-0397-90

根瘤菌的 *nodABC* 和 *nodD* 在结构和功能上保守, 在不同的菌种之间能够互换<sup>[1]</sup>, 是目前所有供试的豆科植物结瘤所必不可少的, 称为共同结瘤基因。另一类是寄生专一性结瘤基因, 如苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 的 *nodPQ* 等<sup>[2]</sup>, 这些基因决定根瘤菌能与哪些种属豆科植物结瘤<sup>[3]</sup>。根瘤菌的结瘤呈寄主专一性, 例如苜蓿中华根瘤菌的寄主范围很窄, 仅能在苜蓿、草木樨和葫芦巴 3 个属的豆科植物结瘤<sup>[4]</sup>。但在 1995 年, 本实验室从新疆苜蓿分离到一株菌株 042B, 既能在大豆又能在苜蓿上结瘤, 而且在大豆上具有较高的共生效率<sup>[5]</sup>。本文拟克隆其 *nodABC*, 并与其他菌株 *nodABC* 序列进行比较, 以阐明 042B 能在大豆和苜蓿结瘤的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌株和质粒(见表 1)。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Strain and plasmid	Relevant characteristic	Source or reference
<b><i>S. meliloti</i></b>		
042B	Forming nodules both on soybean and alfalfa	This laboratory
USDA1002	Wild-type strain	USDA
AK1657	<i>nodC</i> mutant	Hua Zhong Agr Univ
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	Host for recombinant cosmids and plasmids	Laboratory stock
pBBR1MCS-5	Cloning and sequencing vector, Gm <sup>r</sup>	Kovach(1995)
<b>Plasmids</b>		
pLAFR3	Cosmid vector, Tc <sup>r</sup>	Staskawicz <i>et al.</i> (1987)
pMUS389	pUC18 carrying <i>S. meliloti nodABC</i> fragment, for producing probe	Hua Zhong Agr. Univ.
pRK2013	Helper plasmid for mobilization of IncP and IncQ plasmids, Km <sup>r</sup>	Ditta <i>et al.</i> (1980)

\* 欧盟科研基金项目资助。

本文 *nodABC* 基因序列在 GenBank 登记的基因号为: AF038577。

收稿日期: 1998-03-02, 修回日期: 1998-10-30。

## 1.2 方法

1.2.1 培养基: TY 培养基<sup>[6]</sup>, LB 培养基<sup>[7]</sup>和基本培养基 FY 按文献<sup>[8]</sup>配方制备。

1.2.2 DNA 操作技术: 总 DNA 的提取和基因文库的构建参见文献<sup>[9]</sup>。DNA 探针来源于 pMUS389 上的 *nodABC*, 其制备按杜邦公司 Renaissance 试剂盒说明书进行。质粒 DNA 的提取、酶切、克隆和 Southern 杂交按 Maniatis 方法<sup>[7]</sup>进行。DNA 序列测定由赛百胜公司承担。

1.2.3 结瘤试验: 阳性克隆在 pRK2013 的协助下转入苜蓿中华根瘤菌 *nodC* 突变株 AK1657, 在含有庆大霉素的 FY 培养基上筛选接合子, 并接种苜蓿植株, 检查结瘤情况。具体操作按文献<sup>[6]</sup>进行。用不接种、接种 AK1659 和接种 USDA1002 作对照, 各设 8 个重复。

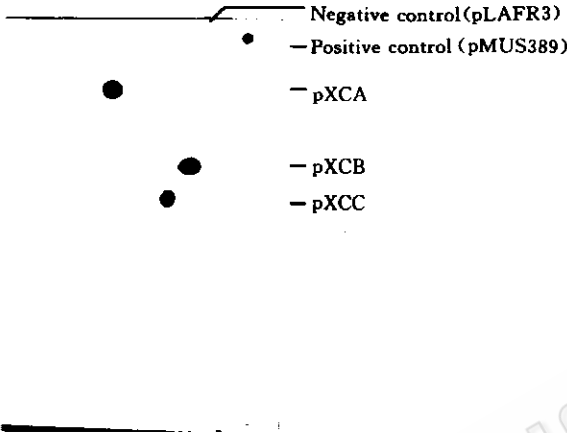


图 1 用 Southern 点杂交筛选阳性克隆

## 2 结果与讨论

### 2.1 *nodABC* 阳性克隆的筛选

042B 基因文库含有 6000 个菌落, 保存在 60 个平板上, 每个平板含 100 个菌落。从这些平板的影印板上的文库菌提取质粒, 点到硝酸纤维素膜上, 与 *nodABC* 探针作点杂交, 得到阳性平板。再将阳性平板上的 100 个菌落分为 10 组, 每组按 10 个菌落分别影印, 提取影印板上的文库菌的质粒, 再作点杂交, 直到找到阳性菌落为止。如此经过 3 轮杂交筛选, 得到 3 个阳性克隆, 分别称为 pXCA、pXCB 和 pXCC(图 1)。

### 2.2 结瘤试验

表 2 表明, USDA1002 和 AK1657(含 pXCB) 仅需 15d 便在苜蓿植株结瘤, 而 AK1657(含 pXCA)、AK1657(含 pXCC)、AK1657 和空白对照经过 30d 也未能在苜蓿植株诱导出根瘤。这一结果证明, pXCB 含有结瘤功能的 *nodABC* DNA 片段。

表 2 AK1657(pXCB) 恢复在苜蓿植株上结瘤能力的实验

Treatment	Nodule number per plant	Time required for nodules occurrence/d	Color of nodules
AK1657(pXCA)	0	0	0
AK1657(pXCB)	4.2	15	Light pink
AK1657(pXCC)	0	0	0
AK1657	0	0	0
USDA1002	6.0	15	Pink
Control	0	0	0

### 2.3 *nodABC* 的克隆和 DNA 测序

从 pXCB 克隆出含有 *nodABC* 的 2.8 kb DNA 片段, 连接到 pUC18, 得到 pXCB1。为了构建测序质粒, 采用 *Sac* I、*Sph* I、*Hind* III、*Bam* HI 和 *Nhe* I 对 pXCB1 进一步酶切, 得到其详细的物理图谱(图 2)。根据此图谱, 用 *Bam* HI + *Hind* III 酶切 pXCB1 得到 0.65 kb 片段, 用 *Nhe* I 酶切 pXCB1 得到 1.45 kb 片段, 用 *Sac* I + *Sph* I 酶切得到 1.3 kb 片段。将上述不同片段分别连接到 pBBR1MCS-5 构建 3 个亚克隆称为 pXCB11、pXCB12 和 pXCB13(图 2)。

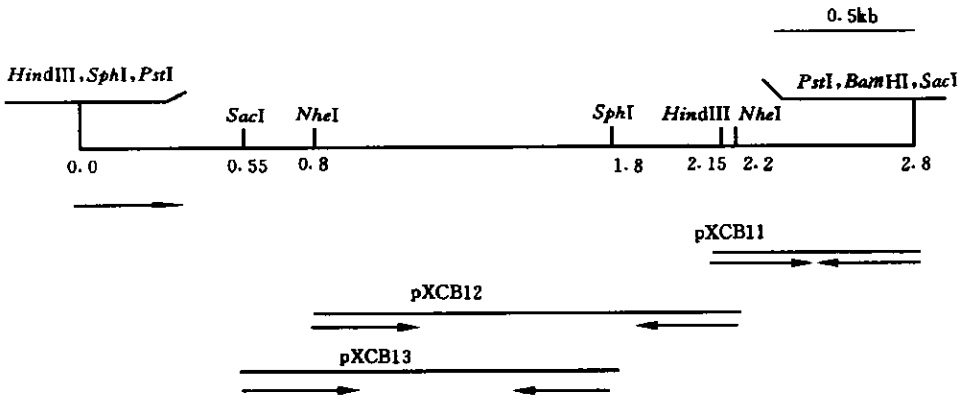


图 2 *S. meliloti* 2.8 kb *nodABC* DNA 片段的物理图谱和序列测定示意图

阿拉伯数值代表片段长度(kb),箭头代表序列测定的方向

通过 DNA 测序和分析,得到图 3 所示的 pXCBI 遗传图谱。从该图谱可见,负链编码 *nodD*,正链编码 *nodA*、*nodB* 和 *nodC*。*nodA* 和 *nodB* 两个基因重叠,*nodB* 的起始密码子和 *nodA* 的终止密码子前一个密码子重叠 4 个碱基。*nodC* 和 *nodB* 之间有长达 86 bp 的非编码区。此外,在 pXCBI 的遗传图谱中,只得到 *nodC* 的部分序列。为了得到其完整的序列,本研究采用了引物延伸的方法,对 *nodC* 的其余部分继续测定。所设计的引物为 Primer 1,所用的模板为 pXCBI,即 pXCBI 用 *Bam*HI 酶切后得到的 7kb 片段连接到 pBluescript SK(+ ) 所得的质粒,它包含了 pXCBI 的外源片段。对 *nodC* 的其余部分测序后,得到了包含完整 *nodABC* 在内的 3304bp DNA 序列。

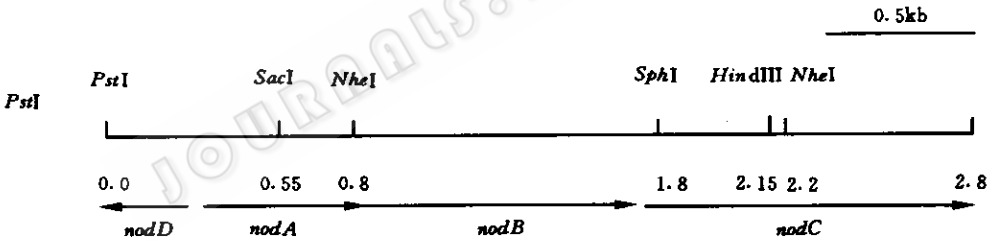


图 3 *S. meliloti* 2.8 kb *nodABC* DNA 片段的遗传图谱

阿拉伯数值代表片段长度(kb),箭头代表基因转录方向

根据计算机分析,042B *nodABC* 的 DNA 片段包括 3 个开放阅读框架,它们对应于 *nod*、*nodB* 和 *nodC*,并推测它们分别编码蛋白 NodA、NodB 和 NodC 的氨基酸数目分别为 196、217 和 403。利用 BLAST 软件<sup>[10]</sup>在非重复的 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中比较发现,042B *nodABC* 碱基序列在整体上分别与苜蓿中华根瘤菌 USDA1021 *nodABC*<sup>[11]</sup>、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) NGR234<sup>[12]</sup> 和费氏中华根瘤菌 (*S. fredii*) USDA257<sup>[13]</sup> 的同源性达 90%~95%。但是,042B 与慢性大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 相距较远,同源性仅为 66%~71%<sup>[14]</sup>。

本研究证明,042B *nodABC* 序列与 USDA1021、NGR234 和 USDA257 高度同源。这一结果与该菌株最初是从苜蓿根瘤分离得来<sup>[5]</sup>,并且能与大豆结瘤的事实是一致的。考虑到其生物学特性与费氏中华根瘤菌相似<sup>[6]</sup>,可以认为该菌株最初可能起源于苜蓿中华根瘤菌或费氏中华根瘤菌。由于 NGR234 是一株能与 110 个属豆科植物结瘤的根瘤菌<sup>[12]</sup>,而 042B 又与其高度同源,所以这表明着 042B 寄主范围广的原因之所在。然而,本文仅从 042B 的 DNA 序列分析揭示了其寄主范围广的间接证据。因此,有关寄主专一性结瘤基因的研究工作正在进行,以期进一步获得直接的分子生物学依据。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] C. A. Shearman, L. Rossen, A. W. B. Johnston *et al.* *EMBO J.*, 1986, **5**:647~652.
- [ 2 ] E. Kondorosi, Z. Banfalvi, A. Kondorosi. *Mol. Gen. Genet.*, 1984, **193**:445~451.
- [ 3 ] B. Horvath, E. Kondorosi, M. John *et al.* *Cell*, 1986, **64**:335~343.
- [ 4 ] F. Debelle, S. B. Sharma. *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**:7453~7472.
- [ 5 ] 陈文新等. 中国农业科学. 1987, **20**(6):22~27.
- [ 6 ] Gao W. M., Yang S. S. *Microbiology*, 1995, **141**:1957~1962.
- [ 7 ] T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [ 8 ] 杨苏声等. 生物工程学报. 1993, **9**(3):193~197.
- [ 9 ] B. Staskawica, D. Dahlbeck, N. Keen *et al.* *J. Bacteriol.*, 1987, **169**:5789~5794.
- [ 10 ] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller *et al.* *J Mol Biol.*, 1990, **215**:403~410.
- [ 11 ] T. T. Egelhoff, R. F. Fisher, T. W. Jacobs *et al.* *DNA*, 1985, **4**:241~248.
- [ 12 ] C. Freiberg. R. Felly, A. Bairoch *et al.* *Nature.*, 1997, **387**(22):394~401.
- [ 13 ] H. B. Krishnan, S. G. Pueppks. *MPMI.*, 1991, **4**:512~520.
- [ 14 ] T. Ueda *et al.* *J. Bacteriol.*, 1995, **177**(2):468~472.

## The Cloning and Sequencing of *nodABC* of *Sinorhizobium meliloti* 042B\*

Yang Xinghong Liu Yanning Yang Susheng

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

**Abstract** Genomic DNA of *S. meliloti* 042B was partially digested to 20~30 kb by restriction endonuclease *Sau* 3AI, and the gene library was constructed with cosmid pLAFR3. Using *S. meliloti nodABC* probe and Southern blot analysis, three clones were found to harbor *nodABC* genes. Cosmids carried by these colonies were named pXCA, pXCB and pXCC, respectively. By triparental mating with the helper plasmid pRK2013, these recombinant cosmids were transferred into *S. meliloti nodC* mutant AK 1657. In this way, it was found that AK1657 containing pXCB restored its nodulation ability on alfalfa. By double enzyme digesting following by Southern blot analysis, a physical map of 25 kb insert of pXCB was made. A sequencing plasmid pXCB1 was constructed by cloning 2.8 kb sized *nodABC* fragment from pXCB into vector pUC18. The DNA sequencing results showed that 042B *nodABC* are highly homologous to *S. meliloti nodABC*, and homologous to *nodABC* of *Rhizobium sp.* NGR234, and to *nodABC* of *S. fredii*, respectively, but have low homologies to *nodABC* gene of the other rhizobia. This might explain the reason why strain 042B can nodulate on both soybean and alfalfa.

**Key words** *Sinorhizobium meliloti*, common *nod* gene, sequencing

\* This Work Was Supported by European Commission INCO-DC Research Project.