

冰核微生物中冰核基因重复序列 PCR 分析*

赵廷昌 孙福在 姜大志** 唐朝荣

(中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

摘要: 在本试验的条件下, *Pseudomonas syringae inaZ* 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区: 5'-GCCGGTTATGGCAGCAGCTGACC-3' 序列既在冰核真菌、细菌中存在, 也在非冰核真菌、细菌中存在, 即冰核细菌、真菌和非冰核细菌、真菌都有扩增产物, 并且产物呈多态性, 同一个种不同菌株间也呈多态性, 说明该引物不适合用于鉴定真菌、细菌中冰核基因是否存在, 也不能用于区分冰核真菌和非冰核真菌以及区分冰核细菌和非冰核细菌, 更不能根据其扩增片段的量和大小说明冰核真菌、细菌冰核活性的强弱。

关键词: 冰核生物, *inaZ* 基因, PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0040-06

PCR OF THE MAIN REPETITION SEQUENCE OF THE INAZ GENE IN THE DNA OF INA⁻ AND INA⁺ BACTERIA AND FUNGI

ZHAO Ting-Chang SUN Fu-Zai JIANG Da-Zhi TANG Chao-Rong

(State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract: The oligonucleotide primer having the 5'-GCCGGTTATGGC AGCAGCTGACC-3' was synthesized, which encodes a main repetition motif of protein produced by the *inaZ* gene. PCR of the primer in the DNA of INA⁻ and INA⁺ bacteria and fungi was done. All of the DNA of INA⁻ and INA⁺ bacteria and fungi expressed bands, the results show that the primer did not work for distinguishing the INA⁻ and INA⁺ organisms and for identification of the ice nucleation activity of the INA organisms by the size and brightness of the PCR products.

Key words: INA Organism, *inaZ* gene, PCR

Maki L R 等^[1]发现冰核细菌以来, 根据国内外报道, 已知有 3 个属中的 20 多个种或变种的细菌具有冰核活性, 有 19 个种是植物病原细菌, 这些冰核细菌是引起霜冻的重要因素^[2,3]。冰核生物的研究已由冰核细菌发展到冰核真菌, 目前已报道了 2 属 9 种(变种)冰核真菌, 除 1 种为地衣真菌外, 其余的 8 个种均属于镰刀菌属 (*Fusarium*)^[4-8]。冰核活性这一特性是否可作为鉴定 (*Fusarium*) 种的特征, 报道的结果不一致^[5-7]。

* 青年“863”资助项目

** 东北农业大学植系

收稿日期: 2000-04-10, 修回日期: 2000-06-30

国内外已对冰核细菌做了大量分子生物学和遗传学研究^[9], Orser 等人已获得了 6 种 INA 细菌的冰蛋白基因克隆, 并在宿主菌 (*E. coli*) 表达了冰核活性, 已测序了 6 个编码的冰蛋白基因, 表明这 6 种编码冰蛋白基因之间具有较高的同源性, 明确了冰核细菌的成冰活性的是由单个结构基因决定的, 该基因缺失导致 INA 细菌成冰活性丧失。冰核基因的显著特点是中间部分碱基呈周期性重复, 每个重复区含保守的 24 个碱基对序列, 但并非完全保守。

姬广海等^[11]认为 PCR 技术可用于快速检测冰核细菌, 并可望从基因水平上快速鉴别冰核细菌的冰核活性强度。张世兴等^[12]利用随机引物研究了云南植物上冰核细菌的多样性, 结果引物 OPA-09 在供试的各菌株间均能扩增出一条大约为 1.707kb 的片段, 此片段是否是冰核细菌的特征性片段, 尚无定论。Hasegawa Y^[10]利用 *Pseudomonas syringae* 的 *inaZ* 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区: 5'-GCCGGTTATGGCAGCAGCTGACC-3' 序列寡聚体做探针, 与 *Fusarium avenaceum* 的 DNA 杂交, 结果为阴性, 因此他认为冰核细菌和冰核真菌在 DNA 水平上可能无同源性。

为深入探索 *inaZ* 的重复基元在冰核生物和非冰核生物的区别及冰核活性强弱鉴别上的应用价值, 我们以 5'-GCCGGTTATGGCAGCAGCTGACC-3' 为引物对一些冰核生物和非冰核生物的染色体 DNA 进行 PCR 扩增, 结果如下。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

研究中使用的菌株见表 1。

表 1 研究使用的供试菌株

菌株	名称	冰核活性	来源
真菌			
39 (对照)	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	开放实验室
F9401	<i>F. sportrichioides</i> Sherb	+	本实验室
F9501	<i>F. graminearum</i> Scgwabe	+	本实验室
F9502	<i>F. graminearum</i> Scgwabe	+	本实验室
F9801	<i>F. moniliforme</i> Sheldon	+	本实验室
F9802	<i>F. moniliforme</i> Sheldon	+	本实验室
AS34.594	<i>F. avenaceum</i> Sacc	+	本实验室
细菌			
PO41 (对照)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	细菌实验室
38	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>achrymas</i>	+	本实验室
40	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymas</i>	+	本实验室
44	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymas</i>	+	本实验室
45	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymas</i>	+	本实验室
47	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymas</i>	+	本实验室
138	<i>Erwinia ananas</i>	+	本实验室
142	<i>E. herbicola</i>	+	本实验室
157	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>hordeli</i>	+	本实验室
158	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>hordeli</i>	+	本实验室
IS11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	本实验室
IS24	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	+	本实验室
PFT-8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> INA ⁻ 突变株	-	本实验室

注: + 有冰核活性, - 无冰核活性

1.2 试剂

PCR 试剂盒及试剂购自华美生物工程公司, 特异引物为加拿大 Sangon 独资上海分公司合成, 序列为 5' -GCCGGTTATGGCAGCACGCTGACC-3'。

1.3 培养基及菌体培养条件

培养基: KB 液体培养基, PDA 液体培养基。

真菌 25℃PDA 液体培养 4d, 200r/min; 细菌 25℃条件下 250r/min 培养 24h。

1.4 方法

CTAB 法提取真菌和细菌的染色体 DNA。

1.5 PCR 扩增

1.5.1 反应体系: 20 μ L: 10 \times 缓冲液, 2 μ L; MgCl₂, 3.0 或 2.5 或 2.0 或 1.5mmol/L; d NTP, 200mmol/L/每种 d NTP; Tap 酶, 0.5U; 引物, 1 μ mol/L; DNA 模板, 2 μ L。

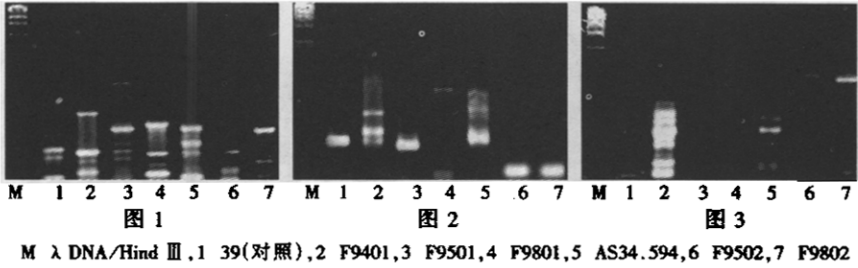
1.5.2 扩增条件: 94℃预变性 3min; 94℃变性 1min, 55℃或 65℃退火 1min, 72℃延长 2min, 30 个循环; 72℃聚合 10min; 扩增反应在我室的 TwinBlock™ system 上完成。

1.5.3 扩增产物电泳: 1% 琼脂糖上对扩增产物进行电泳, 电泳 2h, 用 EB 染色, 在 Eagle eye II 上扫描观察、拍照并分析分子量。

2 结果与分析

2.1 真菌 PCR 扩增

本实验所用的真菌菌株如表 1 所示。1 株为非冰核真菌, 其余均为冰核真菌, 其中 F9502 冰核活性最强, 通过特异引物对有冰核活性的真菌和无冰核活性真菌的染色体 DNA 进行 PCR 扩增, 以便发现 *Pseudomonas syringae inaZ* 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区: 5' -GCCGGTTATGGCAGCACGCTGACC-3' 序列是否与所测定的菌株有互补性等。从图 1 可以看出, 所用引物与供试的菌株均有互补性, 均获得了扩增产物, 即除冰核真菌的 DNA 有扩增产物外, 非冰核真菌也有扩增产物。此外, F9502 扩增片段并不比其他样品的量大, 扩增片段长度也小于其它冰核真菌的扩增片段长度, 所以不能根据扩增片段的量及分子量大小来判断冰核活性的强弱。图 1、图 2、图 3 之间的差异是退火温度和 Mg²⁺ 浓度不同。图 1 退火温度 55℃, MgCl₂ 3.0mmol/L; 图 2 退火温度 65℃, MgCl₂ 3.0mmol/L; 图 3 退火温度 65℃, MgCl₂ 2.5mmol/L。从图 1 可知对照和冰核真菌都有扩增产物, 扩增产物有 2~6 个片段, 并且产物呈多态性, 不同种甚至不同菌株间有很大差异。扩增片段的大小 390bp~1.6kb。升高退火温度到 65℃后, 从图 2 可以看到, 扩增产物的多态性明显减低, 其中对照、F9502 和 F9802 只扩增出 1 个片段。当 MgCl₂ 浓度降到 2.5mmol/L 时 (如图 3 所示), 除 F9401、AS34.594 和 F9802 外其他样品均未扩增出产物, 值得注意的是此条件下 F9401 扩增产物的片段增多且产物最大, 这说明同一菌株在不同退火温度下及不同的 Mg²⁺ 浓度下扩增产物也有差异。通过图 1、图 2 和图 3 比较分析, 说明 *Pseudomonas syringae inaZ* 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区: 5' -GCCGGTTATGGCAGCACGCTGACC-3' 序列既在供试的冰核真菌中存在, 也在供试的非冰核真菌中存在, 即该引物不适于鉴定供试的真菌中冰核基因是否存在, 也不能用于区分供试的冰核真菌和非冰核真菌, 更不能根据扩增片段的量和大小来说明供试的冰核真菌冰核活性的强弱。



2.2 细菌 PCR 扩增

本实验所用的细菌菌株如表 1 所示。1 株 (PO41) 为非冰核细菌, 其余菌为冰核细菌, 其中 IS24 冰核活性最强。通过特异引物对有冰核活性的细菌和无冰核活性细菌的染色体 DNA 进行 PCR 扩增, 以便发现 *Pseudomonas syringae* INAZ 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区: 5' -GCCGGTTATGGCAGCAGCTGACC-3' 序列是否与所测定的菌株有互补性, 结果表明, 所用引物与供试菌株均有互补性, 包括非冰核细菌均获得了扩增产物, 见图 4、图 5、图 6 和图 7。结果与冰核真菌的相似。图 4、图 5、图 6、图 7、图 8 和图 9 之间的差异是退火温度和 Mg^{2+} 浓度不同。图 4 退火温度 55℃, $MgCl_2$ 3.0mmol/L; 图 5 退火温度 55℃, $MgCl_2$ 2.0mmol/L; 图 6 退火温度 55℃, $MgCl_2$ 1.5mmol/L; 图 7 退火温度 65℃, $MgCl_2$ 2.5mmol/L; 图 8 退火温度 65℃, $MgCl_2$ 2.0mmol/L; 图 9 退火温度 65℃, $MgCl_2$ 1.5mmol/L。从图 4 可知对照和冰核细菌有扩增产物, 并且产物呈多态性, 同种细菌不同菌株间也呈多态性, 扩增产物有 2~5 个片段, 无共有片段, 扩增产物的大小约为 400bp~2.4kb。降低镁离子浓度, 如图 5 (Mg^{2+} 2.0mmol/L) 和图 6 (Mg^{2+} 1.5mmol/L) 所示, 扩增产物仍呈多态性, 扩增片段的量和大小仍不能说明冰核活性的强弱。退火温度提高到 65℃, $MgCl_2$ 浓度为 2.5mmol/L 时, 扩增产物仍呈多态性 (如图 7 所示), 其中样品 9、10 扩增产物具有极高的相似性。当降低镁离子浓度到 2.0mmol/L 时, 样品 40 能扩增出一条明亮的片段, 其他样品均未扩增出产物 (如图 8 所示)。继续降低镁离子浓度到 1.5mmol/L 时, 样品 40 仍能稳定扩增的该片段, 分子量大约 1kb (如图 9 所示)。由实验结果可知, 该引物与 40 号样品有较强的互补性。上述结果说明了同一菌株在不同退火温度下及不同的 Mg^{2+} 浓度下扩增产物有差异。通过图 4、图 5、图 6 和图 7 比较分析, 说明 *Pseudomonas syringae* *inaZ* 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区: 5' -GCCGGTTATGGCAGCAGCTGACC-3' 序列既在供试的冰核细菌中存在, 也在供试的非冰核细菌中存在, 即该引物不适用于鉴定供试的细菌中冰核基因是否存在, 也不能用于区分供试的冰核细菌和非冰核细菌, 更不能根据扩增片段的量和大小来说明供试的冰核细菌冰核活性的强弱。

3 讨论

目前, 利用 PCR、PAPD 和 Southern blotting 进行微生物分类、鉴定及同源性比较的技术已经成熟, 并已得到了广泛应用。在冰核微生物研究中也利用 PCR、PAPD 和 Southern blotting 技术的报道^[10-12]。

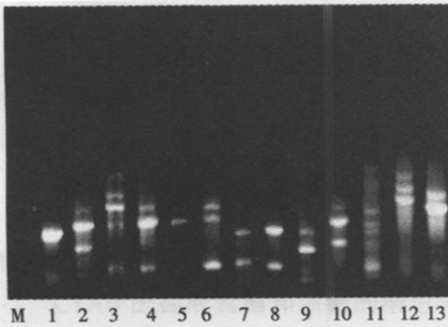


图 4

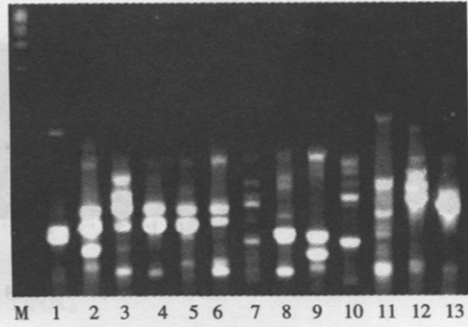


图 5



图 8



图 6

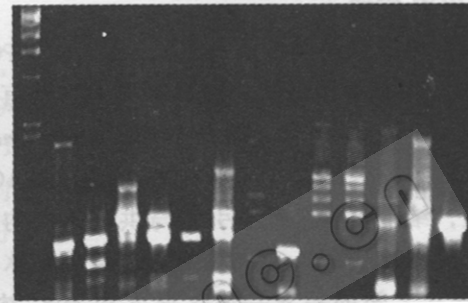


图 7



图 9

M λ DNA/Hind III, 1 PO41, 2 38, 3 40, 4 44, 5 45, 6 47, 7 138, 8 142, 9 157, 10 158, 11 IS11, 12 IS24, 13 PFT-8

从冰核细菌看,冰核活性似乎是种的特性,但没有试验证据。冰核活性这一特性是否可作为鉴定 *Fusarium* 种的特征研究者意见不一。Pouleur^[5]测试了 20 个属真菌的冰核活性,结果仅在 *Fusarium* 一个属发现冰核真菌。在测试的 *Fusarium* 属的 14 个种中, *F. avenaceum* 和 *F. acuminatum* 两个种的全部测试菌株均为冰核真菌,同菌株来源和寄主无关,并且冰核活性稳定,有些菌株保存 30 多年仍保持较高冰核活性。Pouleur 据此认为具有冰核活性是这两个真菌种的特有性状,可以作为 *Fusarium* 种的一个新的鉴别特征。Tsumuke^[6]、Richard^[7]、孙福在^[8]也仅在 *Fusarium* 属中发现冰核真菌,但 Tsumuki 和 Richard 发现冰核活性并非 *F. avenaceum* 和 *F. acuminatum* 种的特有性状,这两个种的许多菌株不具冰核活性,而在 Pouleur 研究中未检测到冰核活性的 *F. tricinctum*、*F. graminearum* 和 *F. moniliforme* 中都发现了冰核真菌菌株。综上所述,在冰核真菌中冰核活性是菌株的特性,不能作为冰核真菌种的特征。丰富的冰核真菌、细菌菌株为我们探索 *inaZ* 的重复基元的利用价值提供了基础,我们应用这些丰富的生物冰核资源进行了本试验,结果表明冰核真菌(细菌)和非冰核真菌(细菌)均有扩增产物且存在多态性。这一结果也从 DNA 水平上支持了作者的冰核真菌中冰核活性是菌株的特性,不能作为冰核真菌种的特征的观点。

已经证明克隆的 6 种编码冰蛋白基因之间具有极高的同源性,并且冰核基因的中间部分碱基周期性重复,每个重复区含保守的 24 个碱基对序列,但并非完全保守^[9]。研究者可以利用重复区含保守的 24 个碱基对序列来对冰核生物和非冰核生物的 DNA 进行 PCR 扩增,看一看扩增结果是否可以用来快速区分冰核生物和非冰核生物以及是否可以用来

鉴定冰核生物的冰核活性的强弱。文献^[11]报道的结果认为是可行的,但在本试验条件下(与文献[11]的条件相同),冰核基因重复序列在冰核生物 DNA 中能扩增出片段,在非冰核生物的 DNA 中也有扩增片段,与文献^[11]报道的结果不一致。我们的结果认为 *Pseudomonas syringae inaZ* 基因产生的蛋白的主要重复基元的编码区:5' -GCCGGTTATG-GCAGCAGCTGACC-3' 序列既在供试的冰核真菌、冰核细菌中存在,也在供试的非冰核真菌、非冰核细菌中存在,即该引物不适用于鉴定供试的真菌和细菌中冰核基因是否存在,也不能用于区分供试的冰核真菌和非冰核真菌及区分供试的冰核细菌和非冰核细菌,更不能根据扩增片段的量和大小来说明供试的冰核真菌、细菌冰核活性的强弱。

参 考 文 献

- [1] Maki L R, Galyon E L, Chang-Chien M, et al. *Appl Microbiol*, 1974, **28**: 456 ~ 460.
- [2] 孙福在. *中国农业科学*, 1996, **29** (5): 62 ~ 67.
- [3] 孙福在, 朱 红, 何礼远, 等. *自然科学进展*, 1994, **4** (4): 449 ~ 456.
- [4] Kieft T L, *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** (7): 1678 ~ 1681.
- [5] Pouleur S, Richard C, Martin JG, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2960 ~ 2964.
- [6] Tsumuki H, Yanai H, Aoki T. *Ann Phytopathol Soc Jpn*. 1995, **66**: 334 ~ 339.
- [7] Richard C, Martin J G, Pouleur S. *Phytoprotection*, 1996, **77** (2): 83 ~ 92.
- [8] 孙福在, 赵廷昌, 张 敏, 等. *菌物系统*, 1999, **18** (2): 34 ~ 38.
- [9] 赵廷昌, 孙福在, 张 敏. 北京: 植物病理学研究, 1997, 77 ~ 82.
- [10] Hasegawa Y, Iahihara Y, Tokuyama T. *BioSci Biotech Biochem*, 1994, **58** (12): 2273 ~ 2274.
- [11] 姬广海, 张世光, 吴建宇, 等. *云南农业大学学报*, 1997, **12** (3): 153 ~ 157.
- [12] 张世光, 韦建福, 胡爱民. *植物病理学报*, 1999, **29** (3): 256 ~ 260.