

# 大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) 苹果酸脱氢酶(mdh)基因的插入失活\*

汪清胤 黄永芬

(哈尔滨师范大学生物系)

David W. Emerich

(美国密苏里—哥伦比亚大学生化系)

## 摘 要

本试验是用粘末端连接法把卡那霉素抗性基因(Kan<sup>r</sup>)插入到大豆根瘤菌 B. j110 的苹果酸脱氢酶(mdh)基因中,使 mdh 基因失活。首先,通过 EcoRI 切点把 Kan<sup>r</sup> 连接到 pTZ18U 载体上,经转化把这一重组 DNA 转入大肠杆菌 XL1-Blue 中,利用含有氨苄青霉素和卡那霉素的选择培养基选出转化菌株,提取 pTZ18U-Kan<sup>r</sup> 质粒 DNA;然后,用 SalI 分别切已克隆在 pTZ19U 中的 B. j110 mdh 基因及 pTZ18U-Kan<sup>r</sup>,经粘末端连接把卡那霉素抗性基因连接到苹果酸脱氢酶基因中间,从而使其失活。再将所得到的这一重组 DNA 用电脉冲法(Electroporation)转入大豆根瘤菌 B. j2143 中,用以检验经插入失活后的苹果酸脱氢酶基因对大豆固氮作用的影响。

**关键词** 大豆根瘤菌;苹果酸脱氢酶基因;插入失活;电脉冲转化

苹果酸是大豆根瘤中含量最多的有机酸,许多报道证明苹果酸能促进固氮作用和呼吸作用;苹果酸脱氢酶(mdh)可以把苹果酸变成草酰乙酸<sup>[2]</sup>(OAA),所以研究 mdh 对大豆固氮作用的影响,对探讨固氮作用的生化机理是有意义的。本实验是把已克隆在 pTZ19U 载体上的大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的 mdh 基因,经限制性内切酶切后,用粘末端连接法把卡那霉素抗性基因(Kan<sup>r</sup>)插入其中,以其通过电脉冲转化法(Electroporation)把这一重组基因再转入另一大豆根瘤菌中,探讨经插入失活后的 mdh 基因对

\* 本试验是在美国密苏里—哥伦比亚大学完成的。

本文于 1992 年 3 月 4 日收到。 This paper was received on March 4, 1992.

固氮作用的影响。

## 材料和方法

### (一)材料

#### 1. 菌株和质粒

大肠杆菌 XL1-Blue 对氨苄青霉素和卡那霉素均敏感,用作受体菌。

E. C. XL1-Blue pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh Sma I<sup>[3]</sup>把含有大豆根瘤菌 B. j110 的苹果酸脱氢酶(mdh)基因的 Sma I 3.5kb 片段 DNA, 连接到载体 pTZ19U 中, 分子量约为 6.3kb, 经转化到大肠杆菌 XL1-Blue 中。具有 Amp<sup>r</sup> 标记。

质粒:pTZ18U 分子量 2.8kb, 具有 Amp<sup>r</sup> 标记, 作为载体。

卡那霉素抗性基因<sup>[4]</sup>(EcoRI)分子量 1.3kb, 购自 Pharmacia 公司。

#### 2. 限制性内切酶:

EcoR I、Kpn I、Sal I、Hind III、Nde I。

#### 3. T<sub>4</sub> DNA 连接酶 (Sigma 公司)

#### 4. LB 培养基<sup>[1]</sup>。

### (二)方法

质粒 DNA 提取方法采用本实验室 Seam Birke 改进的方法, 把生长好的细菌装入 1.5ml 的离心管中, 16000rpm 离心 20 秒, 取菌体沉淀, -70℃ 冰箱中放置 20 分钟, 后悬浮在溶有 200μg 溶菌酶的 300μl STET 缓冲液<sup>[1]</sup>中, 充分混合后, 置冰上 10 分钟, 再放入沸水中 2 分钟, 置冰上冷却 2 分钟, 16000rpm 离心 15 分钟去掉沉淀, 加 15μl 7M 醋酸铵, 混合置冰上 2 分钟, 离心 15 分钟, 把上清移到一新管中, 加 1~1.2ml 乙醇, 放 -70℃ 冰箱半小时, 离心取 DNA, 用 75% 乙醇洗一次, 经真空干燥后溶于 20μl TE 缓冲液中, 4℃ 贮存备用。

酶切、连接、菌落培养及筛选、感受态细胞制取等方法均参照<sup>[1]</sup>。

pTZ18U DNA 经 EcoRI 切后, 与卡那霉素抗性基因(EcoRI)连接, 成一重组的 pTZ18U-Kan<sup>r</sup> 重组 DNA, 由此转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞, 转化细胞通过含有 100μg/ml 氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板培养基进行选择培养, 挑取生长出的单菌落在 LB 液体培养基中培养, 提取质粒 DNA, 用 SalI 切。同时提取 E. C. XL1-Blue pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI 的质粒 DNA, 也用 SalI 切, 将经 SalI 切过上述两质粒 DNA, 利用其粘末端进行连接反应, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 后, 再经含有 100μg/ml 氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板培养基进行单菌落筛选。本实验先后共挑取 95 个单菌落培养, 分别编号为 1<sup>#</sup>~95<sup>#</sup>。每个菌落经 LB 液体培养基培养后, 提取质粒 DNA, 经限制性内切酶 KpnI 切后, 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳上检查质粒 DNA 大小, 以确定重组 DNA 状况, 选择出卡那霉素抗性基因插入到苹果酸脱氢酶基因中的重组质粒, 并保留该菌株, 以备后来的电脉冲(Electroporation)转化用。

## 结果和讨论

1. 经检查 95 个菌落中,只有"47 和"92 具有代表性,其余均不合乎本实验要求。

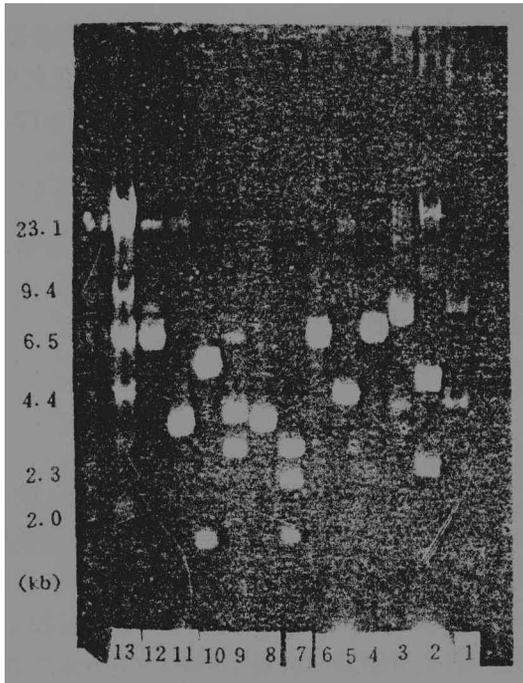


图 1 三种质粒 DNA 及其酶切电泳图谱

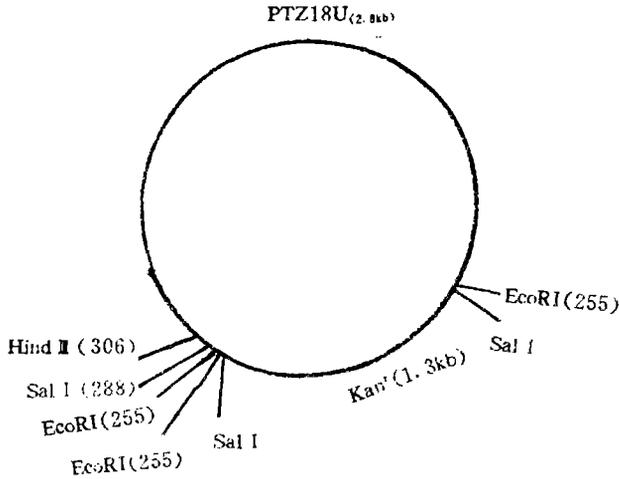
Fig. 1 Three plasmid DNA and their zymograms of restriction enzymes

自右至左分别为 1-3 质粒 DNA,1. "47,2. "92,3. pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI (以下简为 p--mdh); 4-6 为 KpnI 切,4. "47,5. "92,6. p--mdh;7-9 为 KpnI、Hind III 双酶切,7. "47,8. "92,9. p--mdh;10-12 Hind III 切,10. "47,11. "92,12. p--mdh;13.  $\lambda$  DNA Hind III 酶切分子量标记

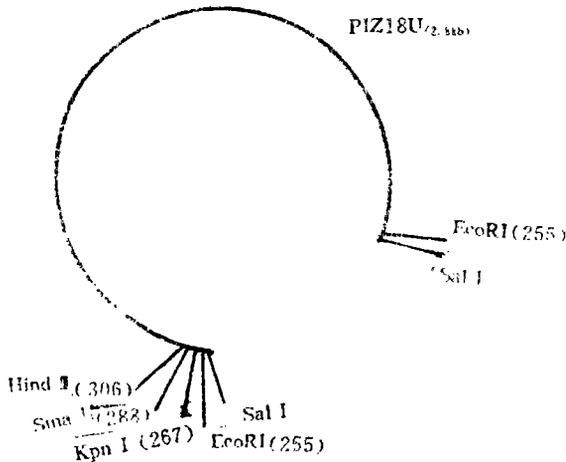
2. 图 1 中 4--6 为 KpnI 切"47、"92 及 pTZ19U-3.5kb B. J110 mdh SmaI 样品,这三个样品切后都仅有一条带,其大小分别为"47-7.0kb,"92-4.1kb,pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI-6.3kb,说明这三个 DNA 序列中,KpnI 仅有一个切点,即在 pTZ19U300 处。

3. 图 1 中 7-9 为 KpnI 和 Hind III 双酶切的电泳图谱,其中"47 有三条带,大小分别为 2.8kb,2.4kb,1.8kb,"92 有两条带,大小分别为 3.5kb 和 0.6kb,pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI 切成两条带,大小分别为 3.5kb 和 2.8kb。

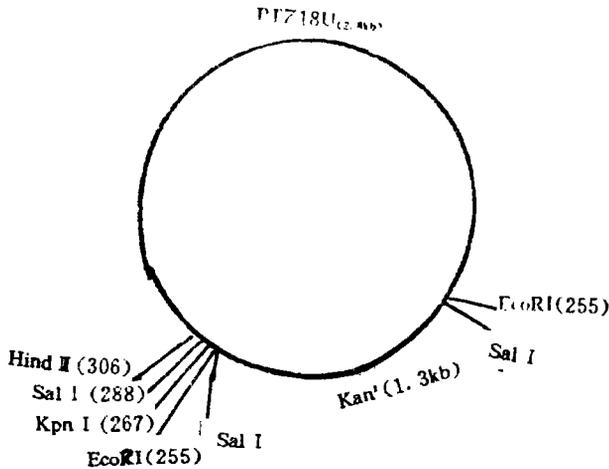
关于"92,由于本实验开始时使用的载体是 pTZ18U,用 EcoRI 切后再与卡那霉素抗性基因(Kanamycin Resistance Genblock (EcoRI), Pharmacia LKB Biotechnology 产品)连接,即呈:



然后用 Sal I 切,有可能成为:



再进行连接反应,有很大机会又自身连接,得到同样的重组质粒 DNA:

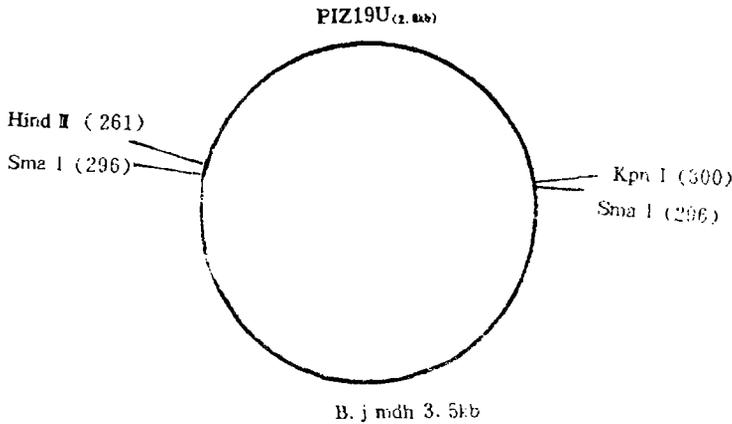


这个重组质粒 DNA 大小约为  $2.8 + 1.3 = 4.1\text{kb}$ ,有一个 Kpn I 切点和两个 Hind III 切

点,所以用KpnI切得一条4.1kb带;当用Hind III和KpnI双酶切时,应该有三个片段,① $2.8+0.7=3.5\text{kb}$ ,② $0.6\text{kb}$ ,③由Hind III 306切点至KpnI 267切点约长为39bp由于第三片段过小,在电泳图谱上未能显示。用Hind III切时,也有3.5kb和0.6kb两个片段,但这一0.6片段比双酶切0.6片段稍大(如图),因我们只用小数点后一位表示大小,所以二片段相差39bp就不计了。

因为pTZ18U具有氨苄青霉素抗性,又重组进卡那霉素抗性基因,所以这一重组质粒DNA具有氨苄青霉素抗性和卡那霉素抗性。

当用KpnI和Hind III切pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI DNA时,由于3.5kb片段是在SmaI切点处插入的,故该质粒DNA为:



按上图切后成两个片段:2.8kb(pTZ19U)和3.5kb(B. j110 mdh SmaI)。

4. 图1中10-12是用Hind III切 $\pi$ 47、 $\pi$ 92和pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI DNA。 $\pi$ 47切成5.2kb和1.8kb两条带, $\pi$ 92切成3.5kb和0.6kb两条带,由于pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI DNA上只有一个Hind III切点,所以只有一条6.3kb带。

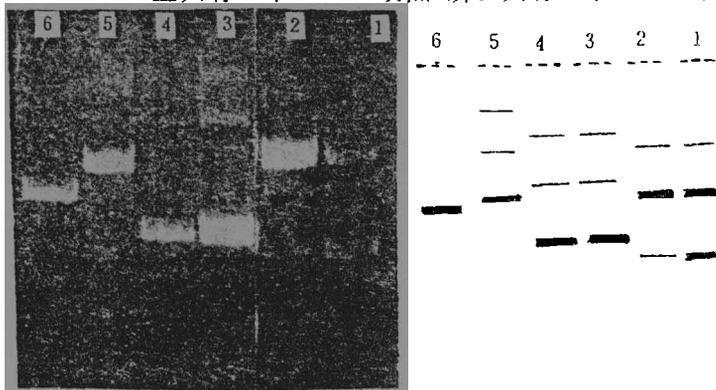


图2 由NdeI切三种质粒DNA

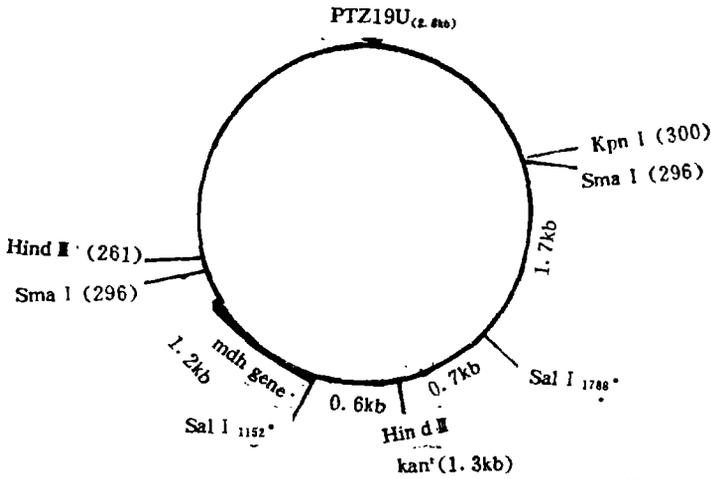
Fig.2 Three plasmid DNA was cut with Nde I

- 1.  $\pi$ 47 DNA(未切),2.  $\pi$ 47DNA(切),3.  $\pi$ 92 DNA(未切),4.  $\pi$ 92 DNA(切),
- 5. p-mdh DNA(未切),6. p-mdh(切)。

5. 在pTZ19U-3.5kb B. j110 mdh SmaI DNA 样品中,所插入的3.5kb DNA片段中有一

个 NdeI 切点<sup>[3]</sup>,为确定卡那霉素抗性基因插入位置,又用 NdeI 切,结果看到 NdeI 没有切开<sup>47</sup>,说明<sup>47</sup>中没有了 NdeI 切点,而 pTZ19U-3.5kb Bjl10 mdh SmaI DNA 切成 6.3kb 的片段(图 2)。

6. 综合上述结果,<sup>47</sup>重组后状况如下:



\* 为 3.5kb B. j 110 mdh Sma I DNA 核苷酸序列号

(1)重组 DNA 大小为:2.8+1.7+1.3+1.2=7.0kb。

(2)在此重组 DNA 中只有一个 KpnI 切点,所以切后有一条 7.0kb 带。

(3)有二个 Hind III 切点,所以切后有 5.2kb(2.8+1.7+0.7)和 1.8kb(1.2+0.6)两条带。

(4)用 KpnI 和 Hind III 双酶切后有 2.8kb、2.4kb(1.7+0.7)和 1.8kb(0.6+1.2)三条带。

(5)根据上述酶切图谱及 3.5kb Bjl10 mdh 序列测定<sup>[3]</sup>,表明卡那霉素抗性基因是在序列 1152 处 SalI 和 1788 处 SalI 切点间插入的,所以看出序列中 1152--1788 处片段被切除,而 NdeI 切点位于 1420 处,正置该被切除片段上,所以重组后的 DNA 没有了 NdeI 切点,故不能切断。

(6)mdh3.5kb Bjl10 mdh 序列的 228-1193 处<sup>[3]</sup>,因为卡那霉素抗性基因是在 1152 处插入,正位于 mdh 基因中,也就是切去 mdh 基因 41 个核苷酸后,插入了卡那霉素抗性基因,符合本实验目的。

(7)由于保存了完整 pTZ19U 氨苄青霉素抗性部份并插入一卡那霉素抗性基因,经转化后,<sup>47</sup>E. C. XL1-Blue pTZ19U-3.5kb Bjl10 mdh SmaI-Kan' 仍具有抗氨苄青霉素和抗卡那霉素标记。可用此菌作为供体菌,通过电脉冲法(Electroporation)把这一重组质粒 DNA 转化到新的根瘤菌中,以探讨经插入失活后的苹果酸脱氢酶基因对大豆固氮作用的影响。

## 参 考 文 献

- [1] Ausubel, F. M. . et al. . *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987
- [2] Day, A. David. . et al. . *Carbon Metabolism and Compartmentation in Nitrogen—fixing Legume Nodules*, *Plant Physiol. Biochem.* . 1991, 29(2): 185~201
- [3] James K. Waters; *Isolation of the Gene For Malate Dehydrogenase from *Bradyrhizobium japonicum**, PhD Thesis, University of Missouri, Columbia, MO, 1991
- [4] Oka, A. . et al. . *Nucleotide Sequence of the Kanamycin Resistance Transposon Tn 903*, *J. Mol. Biol.* , 1981, 147: 217~226

INSERTIONAL INACTIVATION OF THE MALATE DEHYDROGENASE  
GENE FROM BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM

Wang Qingyin Huang Yongfen

(*Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin, 150080*)

David W. Emerich

(*Department of Biochemistry, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA*)

## Abstract

The objective was to insert a kanamycin resistance gene into the gene for malate dehydrogenase (mdh) from *Bradyrhizobium japonicum*. First, a kanamycin resistance gene (Pharmacia) sold as a EcoR I fragment of DNA was ligated into EcoR I restriction site of a cloning vector called pTZ18U. The pTZ18U vector itself has a gene for resistance to ampicillin. The pTZ18U—Kan<sup>r</sup> plasmid was transformed into *E. Coli* and Amp<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup> colonies were selected. The pTZ18U—Kan<sup>r</sup> plasmid DNA was isolated by the boiling mini—prep method and then cut with the restriction enzyme EcoR I to verify the procedure. Next, the malate dehydrogenase gene was cut with the restriction enzyme Sal I and the pTZ18U—Kan<sup>r</sup> vector was also cut with Sal I. The kanamycin resistance gene was ligated into the middle of the gene for malate dehydrogenase. The insertion of the kanamycin cassette inactivates malate dehydrogenase gene. This plasmid was transferred into *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation to test the effect of an inactive malate dehydrogenase gene on nitrogen fixation by soybean.

**Key words** *Bradyrhizobium japonicum* ; Malate dehydrogenase gene; Insertional inactivation; Electroporation