

# 应用 lux AB 基因和 gus A 基因标记大豆根瘤菌的效果<sup>\*</sup>

莫才清 李阜棣

(华中农业大学微生物科学系 武汉 430070)

## 摘 要

应用发光酶基因 lux AB 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 gus A 分别对快生型大豆根瘤菌 HN01 进行了标记,研究了这两种标记系统的检测方法和检测效果,并对这两种标记系统在大豆根瘤菌中的应用进行了分析比较。

**关键词** 发光酶基因; $\beta$ -葡萄糖苷酶基因;大豆根瘤菌;标记系统

根瘤菌是一类革兰氏阴性土壤细菌,因其能与豆科植物根系共生形成具有固氮作用的根瘤,而常常用作微生物肥料接种到豆科植物根圈。然而,如何对接种根瘤菌的结瘤作用进行直观检测和观察,一直是土壤微生物学科研工作者企图解决的问题。新近发展起来的标记基因技术为解决以上问题提供了有效途径<sup>[1]</sup>,而其中应用较多的两种标记基因为 lux AB 基因和 gus A 基因。

含有 lux AB 基因的标记微生物能在其体内产生发光酶,在还原型黄素单核苷酸(FMN H<sub>2</sub>)存在下,氧化底物葵醛并产生发光现象。根据标记微生物的发光现象,可以确定标记微生物的位置、数量等<sup>[2]</sup>。

同样地,含有 gus A 基因的标记微生物,可在其体内产生  $\beta$ -葡萄糖苷酶,能分解底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -葡萄糖苷(X-Gluc)形成吲哚衍生物和糖苷衍生物,而吲哚衍生物能立即聚合形成蓝色沉淀物二聚体,而便于对标记微生物进行观察<sup>[3]</sup>。

本研究采用 lux AB 基因和 gus A 基因分别标记快生型大豆根瘤菌 HN01,研究这两种标记系统的检测方法和检测效果,并对两种标记方法的优缺点进行了分析比较。

## 材料和方法

### 1 菌株和质粒

实验中所用到的根瘤菌菌株和质粒见表 1。根瘤菌用 YM A 培养基培养,大肠杆菌用

<sup>\*</sup> 本研究受国家自然科学基金资助。

LB 培养基培养。抗生素使用浓度如下: 氨苄青霉素 ( Ap ), 60 $\mu$  g /ml; 卡那霉素 ( Km ), 50 $\mu$  g /ml; 链霉素 ( Str ), 100 $\mu$  g /ml 根瘤菌在 28 $^{\circ}$ C 培养 ,大肠杆菌在 37 $^{\circ}$ C 培养

表 1 本研究所用细菌菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株或质粒	相关特性		来源或参考文献
Strains or plasmids	Relevant characteristics		Source or reference
<i>Rhizobium fredii</i>	N H01	Wild type, Ap <sup>r</sup>	本室保存
	HN01LC02	HN01 was marked by lux AB, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	本研究
	HN01Gus	HN01 was marked by gus A, Ap <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	本研究
	pHNC3	A suicide plasmid containing lux AB in Tn5, Km <sup>r</sup>	[ 4 ]
Plasmids	pCAM111	A suicide plasmid containing gus A in mini- Tn5, Str <sup>r</sup>	[ 3 ]
	pRK2013	Helper plasmid, Km <sup>r</sup>	本室保存

2 菌株杂交标记

采用三亲本杂交方法进行大肠杆菌和根瘤菌之间的杂交 ,将供体菌中的 lux AB 或 gus A 基因分别转移到受体菌 HN01 中 ,杂交及筛选方法见参考文献<sup>[4]</sup>。

3 菌落和根瘤的发光活性检测

含发光酶基因的根瘤菌菌落及其所形成根瘤的发光活性检测见文献<sup>[4]</sup>。

4 菌落和根瘤的 GUS 活性检测

将 GUS 底物 5- 溴 - 4- 氯 - 3- 吲哚 - $\beta$ - 葡萄糖苷 ( X- Gluc )溶于下列溶液中: 50mM Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> (pH7. 0) , 1mM EDTA , 0. 1% Sarkosyl , 0. 1% TritonX- 100 ,贮存液浓度为 50mg /ml ,使用浓度为 50 $\mu$  g /ml ,在含有 GUS 底物 ( 50 $\mu$  g /ml )的 YMA 平板中培养含 gus A 基因的根瘤菌标记菌落 ,经培养后可观察到菌落发蓝现象 ;根瘤的 GUS 活性检测可以将豆科植物根系浸入 X- Gluc 溶液中 12 小时后观察根瘤变蓝的情况

结果与讨论

1 含发光酶基因标记根瘤菌及其所形成根瘤的发光活性

经三亲本杂交后所得 Km<sup>r</sup> Ap<sup>r</sup> 抗性根瘤菌菌落点种于 YMA 平板上 ,经 28 $^{\circ}$ C 培养两天后观察菌落的发光活性 发光底物为 1% 萘醛酒精溶液 ,每套培养皿盖内壁滴入萘醛溶液 10 $\mu$  l 即可 ,入暗室用肉眼直接观察 ,菌落的发光活性也可用 X 光片曝光加以记录。

采用发光大豆根瘤菌 HN01LC02 接种大豆黑农 39 进行盆栽 ,40 天后收获植物 ,采集根系上所有根瘤并小心用刀片切开 ,按大小顺序倒扣摆放在培养皿内 ,按菌落发光活性的检测方法检查根瘤的发光活性 ,图 1 为一株大豆根系上所有根瘤的发光活性用 X 光片记录的结果。X 光片可以记录下直径 $\geq$  1mm 根瘤的发光活性。也就是说 ,发光根瘤菌在栽培大豆根系上形成的根瘤 ,其发光活性都能被观察记录下来

根瘤的发光活性也可在植物根系上原位检测并记录下来。将根系上的根瘤小心切开 ,并滴上萘醛溶液 ,入暗室观察并用 X 光片记录。图 2 为一株大豆根系上发光根瘤的原位

## 检测结果

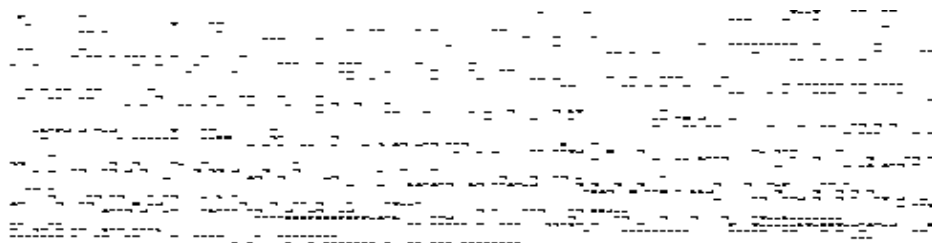


图 1 一株大豆根系上所有根瘤的发光活性

Fig. 1 The nodules on a whole root system and their luminescence activity

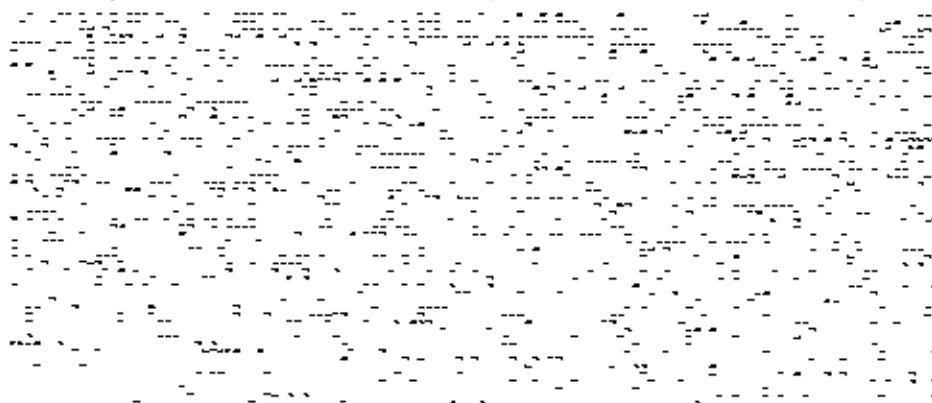


图 2 发光根瘤在根系上的原位检测

Fig. 2 Luminescent nodules on a root system in situ

### 2 含 gusA 基因标记根瘤菌及其形成根瘤的 GUS 活性检测

采用与前面同样的过程,将三亲本杂交所得  $\text{Str}^r \text{Ap}^r$  抗性根瘤菌菌落分别点种于 YMA 平板和 YMA 加 X- Gluc 平板上,检查 X- Gluc 平板上各菌落的 GUS 活性,并找出 YMA 平板上的相应菌落,用于接种大豆进行盆栽实验

考虑到 GUS 底物相当昂贵,本研究采用 gusA 标记大豆根瘤菌 HN01Gus 进行野大豆栽培实验。栽培一个月后收获野大豆,将野大豆根系浸泡于 X- Gluc 溶液中 12 小时后,观察到根瘤的发蓝现象。而作为阴性对照的植株未见到根瘤发蓝现象

### 3 两种标记系统的比较

从前面的研究结果中可以看出,两种标记系统方法均可用于对大豆根瘤菌进行标记,并可以很方便地检测其在豆科植物根系上所形成的根瘤,较以往采用抗性标记技术,免疫抗体技术等均提高了一大步,两种方法均具有快速、准确、原位、直观的特点,但仔细比较两种标记系统在根瘤菌中的应用,各有其优缺点。

3.1 用 gusA 标记根瘤菌检测根瘤具有更为直观的特点:这可从两种方法所得结果的照片可以看出, gusA 标记根瘤菌在豆科植物根系上形成的根瘤,在照片上能清楚地反

映出来,其数量和位置关系一目了然,对于小根瘤或早期根瘤检测起来更为方便;对于大根瘤,由于皮层较厚,底物不易渗入根瘤内,所以大根瘤需要将根瘤切开进行检测<sup>[5]</sup>。

3.2 用 lux AB基因标记根瘤菌检测根瘤具有花费低廉的特点:虽然原位检测发光根瘤不及检测 GUS根瘤直观,但在一定操作技巧下也可获得较为理想的发光根瘤原位检测结果(图 2)。从单株大豆根系上所形成根瘤需底物的成本而言,两种标记方法的差距上万倍, lux AB基因标记检测只需几分钱,而 gusA基因标记检测需要百元以上,这可从下面的药品价格并结合检测浓度可以看出: 萘醛(进口分装), 80元 /100g; X- Gluc(购于中科院生态环境研究中心), 450元 /25mg

## 结 论

发光酶基因 lux AB和  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 gusA可以快速、方便、准确、直观地用于大豆根瘤菌生态学研究,而 lux AB标记则更有利于对根瘤菌田间占瘤率进行测定。

## 参 考 文 献

- [1] 莫才清、周俊初、李阜棣, 1996, 根瘤菌的标记技术及其发展, 生物技术通报, 4: 4- 6
- [2] Gordon S., Stewart A. B. and P. Williams, 1992, lux genes and the applications of bacterial bioluminescence. J. Gen. Microbial. 138: 1289- 1300
- [3] Wilson K. J., 1995, Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. Soil Biol. Biochem. 27: 501- 504
- [4] 莫才清、周俊初、李阜棣, 含发光酶基因的转座子质粒载体的改造及其向根瘤菌 HN01的转座, 应用与环境生物学报, 已接收, 待发表
- [5] Streit W. et al., 1995, Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *R. etli* and *R. tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during the early stages of growth using a constitutive GUS gene fusion. Soil Biol. Biochem. 27: 1075- 1081

## THE EFFECTS OF luxAB AND gusA GENE MARKED *RHIZOBIUM FREDII* ON SOYBEAN ROOT SYSTEM

Mo Caiqing Li Fudi

(Microbiology Department, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

### Abstract

*Rhizobium fredii* HN01 was marked by lux AB and gusA genes separately, test methods and test effects were studied for these two marking- systems. The application of these two marking systems on soybean rhizobia were analyzed.

**Key words** lux AB genes; gusA gene, *Rhizobium fredii*; Marking- system