

# 一种应用 *luxAB* 基因标记大豆根瘤菌的新方法<sup>\*</sup>

李 杰<sup>1</sup> 陈丽华<sup>2</sup> 李希臣<sup>3</sup> 朱延明<sup>1 \* \*</sup>

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 国家农业标准化检测与研究中心  
哈尔滨 150036; 3. 黑龙江省农业科学院生物技术中心, 哈尔滨 150086)

**摘要** 研究构建了带有 *luxAB* 基因和 *parCBA/DE* 基因的重组质粒 pHN208, 并通过三亲本杂交法将该质粒导入 6 株大豆根瘤菌中, 获得工程菌株。工程菌株在自生条件下和共生条件下的发光稳定性研究结果表明, 重组质粒 pHN208 可在根瘤菌中稳定传代。比较了工程菌与出发菌株的竞争结瘤能力, 结果表明 pHN208 的导入不影响根瘤菌的竞争结瘤能力。从而建立了一种更为简便的应用 *luxAB* 基因标记大豆根瘤菌的新方法, 为检测大豆根瘤菌的结瘤情况以及进一步筛选强竞争结瘤大豆根瘤菌提供了一种适用的方法。

**关键词** *luxAB* 基因; *parCBA/DE* 基因; 大豆根瘤菌; 竞争结瘤

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)03-0172-04

## 0 前言

长期的实践表明, 根瘤菌的人工接种对于豆科植物和根瘤菌共生体系的形成起保证作用, 从而提高豆科植物的产量。但是由于土著性根瘤菌的固氮效率较低和竞争障碍作用的存在, 使人工接种的效果受到很大限制。因此, 选育既具有强竞争结瘤能力, 又能高效固氮的根瘤菌是接种根瘤菌剂以大幅度提高豆科植物产量的前提<sup>[1]</sup>。尽管已有一些研究表明可以通过抑制土著菌的生长来提高根瘤菌剂的占瘤率, 但是筛选强竞争结瘤大豆根瘤菌仍具有重要的意义。一方面, 可以作为受体菌导入固氮基因, 获得优良的固氮工程菌; 另一方面, 也可作为材料, 进行竞争结瘤分子遗传学研究以及相关基因克隆。同时, 由于根瘤菌的竞争结瘤能力受土壤条件和宿主等多方面因素的影响, 各地区应根据实际情况选育相应的根瘤菌菌株。因此建立一种简便适用的筛选强竞争结瘤能力大豆根瘤菌的方法是十分必要的。莫才清等利用改造的转座子 pH-NC3 将发光酶基因(*luxAB*)整合到根瘤菌的基因组中, 可作为标记研究<sup>[2]</sup>。但是由于转座子的插入

可能导致结瘤相关基因的突变, 从而影响宿主菌的结瘤能力, 因此不能直接用于测定根瘤菌的结瘤情况。在以前的研究中, 我们将质粒 pLAF43 上的 COS 位点消除, 并克隆上 *parCBA/DE* 基因, 获得重组质粒 pHN207。研究了质粒 pHN207 在慢生型大豆根瘤菌中的遗传稳定性, 发现重组质粒 pHN207 在自生条件下和共生条件下均可稳定遗传<sup>[3]</sup>。说明以质粒上的基因标记大豆根瘤菌是可行的, 并有可能以此为基础, 建立一种简便适用的筛选强竞争结瘤能力大豆根瘤菌的方法。本文在这方面开展了进一步的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 大豆品种

东农 42、黑农 37。

#### 1.1.2 菌株

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 大豆根瘤菌 DN01、DN02、DN03、HN01、HN02、HN03, 分别从东农 42、黑农 37 根瘤中分离得到。

#### 1.1.3 质粒

\* 收稿日期: 2003-01-22

\* \* 通讯作者 Tel/Fax: +86-451-5190161. E-mail: ymzhu2001@hotmail.com

作者简介: 李杰(1972-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为植物基因工程与分子生物学。

pRK2013 为三亲本杂交辅助质粒, pHN206、pHN208 质粒图谱见图 1。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

质粒提取、酶切、连接、大肠杆菌感受态制备、转化、琼脂糖凝胶电泳等操作均参见文献<sup>[4]</sup>, DNA 片断回收参考鼎国 DNA 片断快速回收试剂盒说明。

1.2.2 大豆根瘤菌的分离

取田间栽培大豆东农 42、黑农 37 根部, 用自来水小心洗净根部泥土。随机选取根瘤, 用 95% 酒精消毒 5 分钟, 然后用 0.1% 升汞消毒 5 分钟, 再用无菌水洗 10 次。然后将根瘤夹破, 取根瘤汁液在 SM 平板上划线, 28℃ 培养。待长出菌落后, 进行接种实验。将能在大豆上结瘤的菌落确定为根瘤菌。选取形态有明显差异的菌株各 3 株用于下一步的实验。从东农 42 上分离到的根瘤菌菌株依次命名为 DN01、DN02、DN03, 从黑农 37 上分离到的根瘤菌菌株依次命名为 HN01、HN02、HN03。

1.2.3 重组质粒导入根瘤菌

采用三亲本杂交法<sup>[5]</sup>将质粒 pHN208 分别导入根瘤菌菌株 DN01、DN02、DN03、HN01、HN02、

HN03。选取发光菌落, 分别命名为 DN01 (pHN208)、DN02 (pHN208)、DN03 (pHN208)、HN01 (pHN208)、HN02 (pHN208)、HN03 (pHN208)。

1.2.4 工程菌发光的检测

大肠杆菌、根瘤菌的菌落以及根瘤的发光检测方法参见文献<sup>[2]</sup>。

1.2.5 盆栽实验

采用改进的双层钵做无菌砂培盆栽实验, 采用 Fahraeus 无氮营养液<sup>[6]</sup>。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pHN208 的构建

为了提高工程质粒在根瘤菌中的稳定性, 我们将质粒 pHN206 上的 *cos* 位点去除, 构建了工程质粒 pHN208。其构建路线见图 1。用限制性核酸内切酶 *Bgl*II 酶切质粒 pHN206, 回收 26500bp 的片断, 自连, 转化大肠杆菌 DH5α。挑取发光菌落, 提质粒, 经 *Bgl*II 酶切鉴定只见一条 26500bp 的带(图 2), 证实工程质粒 pHN208 构建正确。

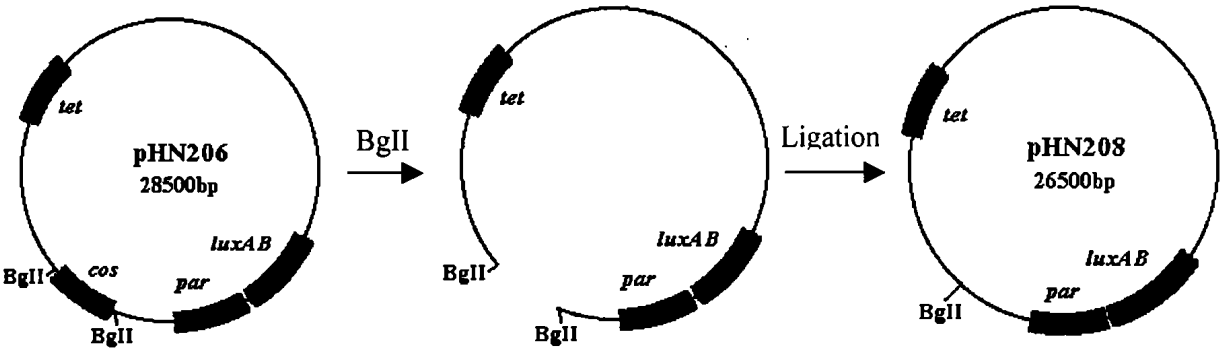


图 1 工程质粒 pHN208 的构建

Fig. 1 The construction of recombinant plasmid pHN208

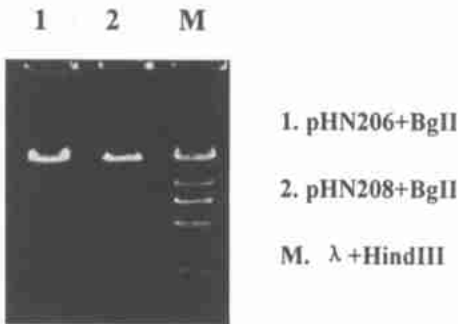


图 2 工程质粒 pHN208 的酶切鉴定

Fig 2 The identification of recombinant plasmid pHN208 with restricted endonuclease

2.2 自生条件下重组质粒 pHN208 在根瘤菌中遗传稳定性的研究

挑取根瘤菌 DN01 (pHN208)、DN02 (pHN208)、DN03 (pHN208)、HN01 (pHN208)、HN02 (pHN208)、HN03 (pHN208) 的单菌落, 在不含抗生素的 SG 液体培养基中连续传代 5 次。每次传代前取 1ml 菌液稀释涂平板, 测定发光菌落的比例(表 1)。实验结果表明, 在连续转接条件下不同的根瘤菌中质粒 pHN208 的保持率均为 100%, 说明在自生条件下重组质粒 pHN208 在根瘤菌中可稳定遗传。

表 1 在连续转接条件下根瘤菌中质粒 pHN208 的保持率  
Table 1 Inheritable percentage of pHN208 tested in different Rhizobium strains after continuous inoculations

根瘤菌菌株 Rhizobium strains	转接次数与质粒保持率 Number of inoculations and inheritable percentage of plasmids(%)				
	1	2	3	4	5
DN01(pHN208)	100	100	100	100	100
DN02(pHN208)	100	100	100	100	100
DN03(pHN208)	100	100	100	100	100
HN01(pHN208)	100	100	100	100	100
HN02(pHN208)	100	100	100	100	100
HN03(pHN208)	100	100	100	100	100

2.3 共生条件下重组质粒 pHN208 在根瘤菌中遗传稳定性的研究

在无菌砂培条件下, 将接种工程菌株的供试大豆(各 5 株)根系上的所有根瘤摘下, 按文献的方法检测根瘤发光活性, 测定结果见表 2。从实验结果可以看出, 共生条件下重组质粒 pHN208 在各菌株中均可稳定遗传。

2.4 工程菌与出发菌株竞争结瘤能力的比较

将工程菌菌液和出发菌菌液分别按体积比 10 : 1、1 : 1、1 : 10 混合接种砂培大豆东农 42, 收获后取根瘤测定工程菌的占瘤率(发光根瘤占总根瘤的比

例)。同时用稀释平板法测定各菌液的活菌数, 计算工程菌数占总菌数的比例, 即活菌数比。实验结果见表 3。活菌数比与工程菌的占瘤率两组数据的相关系数  $r=0.9998$ , 说明工程菌和出发菌的竞争结瘤能力相近, 即重组质粒 pHN208 的导入不影响根瘤菌的竞争结瘤能力。

表 2 工程菌株形成根瘤的发光活性检测  
Table 2 The results of fluorescent detection of nodules from engineering strains

工程菌株 Engineering strains	大豆品种 Soybean cultivar	检测根瘤总数 Total nodules tested	发光根瘤总数 Total fluorescent nodule	发光根瘤百分率(%) Percentage of fluorescent nodule(%)
DN01 (pHN208)	东农 42	135	135	100
	黑农 37	126	126	100
DN02 (pHN208)	东农 42	143	143	100
	黑农 37	128	128	100
DN03 (pHN208)	东农 42	119	119	100
	黑农 37	130	130	100
HN01 (pHN208)	东农 42	124	124	100
	黑农 37	141	141	100
HN02 (pHN208)	东农 42	150	150	100
	黑农 37	129	129	100
HN03 (pHN208)	东农 42	143	143	100
	黑农 37	136	136	100

表 3 工程菌与出发菌株竞争结瘤能力的比较  
Table 3 Compare the compete nodulation ability of engineering strains with that of wild type

供试菌株 Strains tested	菌液体积比 Volume ratio of Rizubium solution	活菌数比(%) * Ratio of live Rizubium number	发光根瘤数 Total fluorescent nodule	总根瘤数 Total nodule tested	工程菌的占瘤率(%) Nodulation occupancy of engineering strains
DN01(pHN208)/ DN01	10 : 1	86.8	68	80	85.0
	1 : 1	39.7	37	92	40.2
	1 : 10	6.2	5	85	5.9
HN01(pHN208)/ HN01	10 : 1	93.9	71	77	92.2
	1 : 1	60.5	49	82	59.8
	1 : 10	13.3	13	90	14.4

注: \* 活菌数比= 工程菌活菌数/ 总活菌数× 100%。各菌液的浓度(个活菌/ mL)分别为:  
DN01(pHN208), 2. 3× 10<sup>8</sup>; DN01, 3. 5× 10<sup>8</sup>; HN01(pHN208), 2. 6× 10<sup>8</sup>; HN01, 1. 7× 10<sup>8</sup>

3 讨论

缪礼鸿等曾检测了以 pLAFR1 为载体的重组质粒在慢生型大豆根瘤菌中的稳定性, 结果表明在无选择压力的 YMA 培养基上培养 7~10 天后重组质粒的丢失率为 56%; 在共生条件下, 重组质粒的丢失率为 40%~70%(未发表)。尽管本研究构建的重组质粒 pHN208 来源于 pLAFR3(是在 pLAFR1 的 EcoRI 位点处插入了多克隆位点), 但是它在大豆根

瘤菌中具有很高的遗传稳定性。分析其原因有二: 一是 *parCBA/DE* 基因的引入。*parCBA* 操纵子编码 1 个质粒多聚体解离系统, 并含有解离多聚体所必需的顺式作用位点, *parDE* 操纵子编码的蛋白可通过杀伤部分子代细胞来提高质粒的稳定性。这与杨江科等的研究结果一致<sup>[7]</sup>; 二是消除了 pLAFR3 的 *cos* 位点序列, 防止质粒多聚体的形成, 提高质粒拷贝数, 以保证在子细胞中的有效分配。

以 *luxAB* 基因作为报告基因, 可简便、快速、直观、准确对根瘤菌的结瘤情况进行检测<sup>[4]</sup>。本研究

的结果表明, 以质粒为载体的 *luxAB* 基因标记可在大豆根瘤菌中稳定遗传, 并且不影响大豆根瘤菌的结瘤能力。可以更为简便地用于大豆根瘤菌的标记, 为检测大豆根瘤菌的结瘤情况以及进一步筛选强竞争结瘤大豆根瘤菌提供了一种适用的方法。

参 考 文 献

1 葛诚, 樊惠, 徐玲玫. 快生型大豆根瘤菌遗传学研究进展[ J]. 应用微生物, 1987, 1: 7-12.

2 莫才清, 覃雅丽, 周俊初, 等. 应用发光酶基因对快生型大豆根瘤菌 HN01 结瘤作用进行检测[ J]. 微生物学报, 1998, 38(3): 213-218.

3 李友国, 李杰, 刘墨青, 等. 导入 *detABD* 和 *parCBA/DE* 基因提高大豆慢生根瘤菌固氮效率和稳定性的研究[ J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 742-750.

4 萨姆布鲁克, 拉塞尔著, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南[ M]. (第三版), 北京: 科学出版社, 2002.

5 Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, et al. Beta—Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram—negative bacteria[ J]. Microbiology, 1995, 141 (7): 1691-1705.

6 Vincent J. M. A manual for practical study of the root—nodule bacteria. International biological programme handbook No. 15[ M]. Blackwell Scientific Publication Oxford, 1970.

7 杨江科, 刘墨青, 周琴, 等. 以 *luxAB* 为报告基因的大豆根瘤菌的竞争结瘤研究[ J]. 中国农业科学, 2002, 35(1): 110-112.

A NEW METHOD TO LABEL SOYBEAN RIZHOBIA USING *luxAB* GENE

Li Jie    Chen Lihua    Li Xichen    Zhu Yanming

- (1. Life Science College of North—East Agricultural University, Harbin, 150030;
2. National Agricultural Standerlization Monitor and Normalization Center, Heilongjiang, 150036;
3. Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin, 150086)

**Abstract** Recombinant plasmid pHN208 with *luxAB* gene and *parCBA/DE* gene was construted. Then the pHN208 was transferred into 6 soybean rizophia strains via tri-parental conjugation. The results showed that the pHN208 was inherited stablly in rizophia under both free-living and symbisis conditions. The results of plant pot experiments showed that the introduction of pHN208 didn't affect the nodulation occupancy of rizophia. Accord—ing to those results, a new method was established to label rizophia with *luxAB* gene. The method can be used to select rizophia with high compeptitive nodulation ability.

**Key words** *luxAB* gene; *parCBA/DE* gene; Soybean rizophia; Compeptitive nodulation

欢迎订阅《农界》杂志

《农界》杂志是由山东省科技厅主办的一本大型农业科技月刊。国际标准刊号: ISSN1001—9960 国内统一刊号: CN37—1021, 邮发代号: 24—72 广告经营许可证: 3700004000076。它重点以全国涉农科研人员、农资企业市场开发、经营、管理人员和部分科技知识型农民读者为对象, 定位于服务农业市场、农业博览会和农资交易会, 发展农业, 富裕农村, 致富农民, 着重宣传国家的农业政策、农资法规, 报道农业市场动态、农资流通走势, 传播农业科技知识、信息, 指导农村读者进行科学种植、养殖和加工, 并能 为农业科研单位和涉农企业提供全面、配套而周到的服务。

主要栏目设置: 政策法规搜集, 农界名流专访, 创业策划, 致富导航, 市场预警, 市场焦点调查, 植物精品园, 作物高效栽培详解, 农资营销与策划, 农界大超市, 绿色农业点击, 农业实用技术专科学校, 企业名片, 读者点题, 读者热线, 农界名牌专柜, 全国农业会展早报, 农业专业市场招商信息等 30 余个栏目。

本刊为月刊, 四封彩印, 国际流行大 16 开本, 64 页, 除随《科技信息》杂志同期发行外, 也自办邮寄发行。单月每本 5 元, 年订费 60 元。来信附邮资 2 元即赠样刊, 阅后满意付款再续赠下期杂志。订阅可通过邮局直接汇款至本刊发行部。

汇款详址: 济南市经四路 372 号省科技情报大厦 14 楼《农界》杂志社发行部  
电话: 0531—7064389      收款人: 孔艳芹      邮编: 250021