

# 慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)

## USDA110 菌株 3-羟丁酸脱氢酶基因(*bdhA*) 的克隆、序列及特性

戴美学<sup>1</sup>, 武波<sup>2</sup>, 柏学亮<sup>2</sup>, 张成刚<sup>1</sup>, 马庆生<sup>2</sup>, Trevor C. Charles<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015; <sup>2</sup> 广西大学/农业部农业分子遗传重点实验室 南宁 530005;

<sup>3</sup> 滑铁卢大学生物系, 滑铁卢 N2L 3G1 加拿大)

**摘要:**通过功能互补试验,从慢生型大豆根瘤菌 USDA110 菌株基因文库中筛选到能互补广宿主根瘤菌 NGR234 的 *bdhA* 突变体菌株 NGRPA2 和苜蓿根瘤菌的 *bdhA* 突变体菌株 Rm11107,使之恢复 Hbu<sup>+</sup> 表型的克隆;经酶活测定和 Southern 杂交证明该克隆含有 *bdhA* 基因。测定了 *bdhA* 基因全序列,并在 GenBank 登记(登记号为:AY077581)。该基因由 789 个碱基对组成,编码分子量为 27.59 ku,含 262 个氨基酸残基的 3-羟基丁酸脱氢酶。在该基因的开放阅读框内插入 interposon  $\Omega$ Km,并通过同源重组构建了 *Bradyrhizobium japonicum bdhA* 突变体(*bdhA*: $\Omega$ Km)。植株试验未显示 *bdhA* 基因的突变对结瘤、固氮有明显影响。

**关键词:**慢生型大豆根瘤菌 3-羟丁酸脱氢酶 3-羟丁酸脱氢酶基因 聚羟丁酸

## Cloning, Sequence and Characteristics of 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Encoding Gene (*bdhA*) in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 Strain

DAI Mei-xue<sup>1</sup>, WU Bo<sup>2</sup>, BAI Xue-liang<sup>2</sup>, ZHANG Cheng-gang<sup>1</sup>, MA Qing-sheng<sup>2</sup>, Trevor C. Charles<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Shenyang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015; <sup>2</sup> The Key Laboratory of Agricultural Molecular Genetics, Chinese Ministry of Agriculture/ Guangxi University, Nanning 530005;

<sup>3</sup> Biology Department, University of Waterloo, Waterloo N2L 3G1, Canada)

**Abstract:** A clone which can restore the ability of *bdhA* mutant strains NGRPA2 and Rm11107 to utilize 3-hydroxybutyrate as sole carbon source (Hbu<sup>+</sup>) was screened out by complementation experiment from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 genomic library. It was confirmed by Bdh assay and Southern blot that this clone contains *bdhA* gene. The entire sequence of *bdhA* gene was sequenced and the sequence was deposited in GenBank at the accession number of AY077581. *bdhA* gene consists of 789 base pairs and encodes Bdh with 262 amino acid and MW 27.59 ku. Interposon  $\Omega$ Km was inserted into the *bdhA* ORF at EcoR I site and the *bdhA* mutant was constructed in *B. japonicum* by homologous recombination. Plant test result did not show obvious effects of mutation of *bdhA* gene on nodulation and nitrogen-fixation.

**Key words:** *Bradyrhizobium japonicum*; Bdh; *bdhA* gene; PHB

很多细菌在非碳素营养(如 N、P、O<sub>2</sub> 受限)而碳源过剩时,在细胞内积累聚羟丁酸(poly-3-hydroxybutyrate, PHB),而当碳源不足时,动用这种内部储

存的 PHB 作为碳源和能源<sup>[1]</sup>。

根瘤菌普遍具有积累 PHB 的能力,但在不同种属间存在一定差异。如 *Rhizobium meliloti* 只在自

由生长阶段及侵染线内的菌体中积累 PHB,而不能在已分化的类菌体内形成 PHB<sup>[2,3]</sup>; *Bradyrhizobium japonicum* 则不同,不仅可在自由生长的细胞内积累 PHB,而且在共生阶段的类菌体内也可积累高达细胞干重 50% 的 PHB<sup>[4]</sup>。有人推测,类菌体中积累的 PHB 的作用是在植物光合作用降低时为固氮过程提供能量,或在根瘤衰老后延续固氮作用<sup>[5~7]</sup>,但迄今没有发现直接证据。

关于细菌 PHB 代谢的生化 and 分子生物学的研究已有许多报道,其在 *Rhizobium meliloti* 中的代谢途径已较为明确<sup>[8]</sup>。3-羟丁酸脱氢酶(3-hydroxybutyrate dehydrogenase, Bdh; EC1.1.1.30)是 PHB 分解代谢过程中的一个关键酶,催化 3-羟丁酸(3-hydroxybutyrate; HB)单体氧化为乙酰乙酸(aceoacetate; AA)<sup>[9]</sup>。对 *Bradyrhizobium japonicum* 的 Bdh 已有一些生化方面的研究<sup>[10]</sup>,但其分子生物学方面的工作还未见报道。

笔者成功地从 *Bradyrhizobium japonicum* 基因文库中克隆到 *bdhA* 基因,完成了全序列测定,构建了突变体并研究了该基因突变对结瘤固氮的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

见表 1。

### 1.2 培养基和培养条件

所用培养基有 LB、TY、YMB( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ :  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2;  $\text{NaCl}$  0.1; Mannitol 10; 酵母提取物 0.5), M9 基本培养基<sup>[19]</sup>, M9-R-HB( M9 基本培养基中加入终浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 R-HB 作为惟一碳源)。

根瘤菌培养于  $30^\circ\text{C}$ , 大肠杆菌培养于  $30^\circ\text{C}$  或  $37^\circ\text{C}$ 。如需要使用抗生素,除文中特别说明外,使用浓度为: Amp  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Tc  $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Km  $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; Rf  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

### 1.3 酶和试剂

限制性内切酶、连接酶为 Promega 或 MBI 产品, 抗生素购自 Sigma 和 Boehringer Mannheim。

### 1.4 DNA 制备

质粒 DNA 的制备按文献<sup>[20]</sup>的方法进行。根瘤菌总 DNA 的制备按文献<sup>[21]</sup>方法进行。

### 1.5 基因组文库的构建

EcoR I 部分酶切 *B. japonicum* USDA110 总 DNA, 回收 10~25 kb 片段, 与经去磷酸化处理的广

宿主粘粒载体 pLAFR1 连接后, 用 Stratagene 包装试剂盒进行包装, 于 DH5 $\alpha$  中增殖。

### 1.6 杂交试验

Southern blot 杂交根据 Roche 推荐的方法进行, DNA 探针采用 DIG High Prime Kit 进行标记。

### 1.7 DNA 序列测定

将要测序的片段亚克隆到载体 pUC19, 采用 Amersham pharmacia biotech 的 Thermo Sequenase<sup>TM</sup> Cy<sup>TM</sup>5/Cy5.5 末端标记的测序试剂盒在 Visible Genetics OpenGene<sup>TM</sup> Long-Read Tower<sup>TM</sup> 测序仪上进行。所用引物 M13 Forward: 5' gtaaacgacggccagt 3' (17mer); M13 Reverse: 5' caggaacagctatgac 3' (17mer); T7 Forward: 5' taatacgaactcattaggg 3' (20mer) 以及根据需要自行设计的引物(见文中)。数据采用 Macvector version 6.0.1 (Oxford Molecular Group) 处理。

### 1.8 Bdh(3-hydroxybutyrate dehydrogenase) 酶活测定

收集菌体, 用  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7.8,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  缓冲液洗两遍, 然后将菌体悬于 2~4 ml  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7.8,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 10% 甘油,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  巯基乙醇缓冲液中, 然后在超声波破碎仪 Ultrasonics Sonifier Cell Disruptor Model W185-D 上  $4^\circ\text{C}$  处理 2 min。  $15\ 000 \times g$  离心 20 min 去除细胞碎片。无细胞提取液的总蛋白采用文献<sup>[22]</sup>方法测定。Bdh (E. C 1.1.1.30) 酶活测定根据文献<sup>[23]</sup>方法进行。

### 1.9 植株试验

植株试验所用容器是根据 Magenta 缸的原理自行设计组装的。由上下两容器组成, 上面的容器为上口直径 15 cm 的塑料盆, 内装栽培基质, 中心部位穿一条粗棉絮条以使上下两容器相连; 下面为 1 000 ml 的玻璃烧杯, 内盛营养液。栽培基质为 50% 细沙和 50% 蛭石。每盆加入 400 ml Jensen 氏无氮营养液, 锡箔覆盖,  $121^\circ\text{C}$  灭菌 1 h, 冷却后移去锡箔, 植入 3 日龄大豆芽苗(供试大豆品种为 Bayfield)。 植苗后第 2 天, 接入  $10 \text{ ml}$  浓度为  $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{ml}^{-1}$  的菌液稀释液(YMB  $30^\circ\text{C}$ , 200 r/min 培养 4~5 d), 空白对照组接入同样体积的灭菌 ddH<sub>2</sub>O。

供试植株培养于自动调温、调湿、调光的中型培养室内; 16 h  $25^\circ\text{C}$ , 光照 8 h  $20^\circ\text{C}$ , 黑暗; 光照强度  $420 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{Sm}^{-1}$ 。 根据需要向培养容器中补加灭菌的 ddH<sub>2</sub>O, 植株试验周期为 6 周。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特征 Relevant characteristics	来源或参考文献 Sources and references
<b>大肠杆菌 <i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR1</i> ( $\gamma$ r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1</i> ( $\Delta$ <i>argF-lacZYA</i> ) U169 $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\lambda$ A <sup>-</sup>	GIBCO BRL
S17-1	<i>E. coli</i> 294 (F <sup>-</sup> <i>thi pro hsdR</i> ) <i>recA</i> derivative	[ 11 ]
MT616	MT607 (pRK600) ;mobilizer	[ 12 ]
<b>根瘤菌 <i>Rhizobia</i></b>		
<i>Rhizobium meliloti</i> ( <i>Sinorhizobium meliloti</i> )		
Rm1021	SU47 <i>str-21</i>	[ 13 ]
Rm11107	Rm1021 <i>bdhA1</i> : :Tn5	[ 8 ]
<i>Rhizobium</i> spp.		
NGR234	广宿主 , Bbroad-host , Rf <sup>t</sup>	[ 14 ]
NGRPA2	NGR234 <i>bdhA1</i> : : $\Omega$ SmSp	[ 9 ]
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
BjUSDA110	野生株 Wild-type strain	USDA ,Beltsville ,MD
Bj30064	<i>bdhA</i> : : $\Omega$ Km	This work
<b>质粒 Plasmid</b>		
pLAFR1	IncP cosmid cloning vector ,Tc <sup>r</sup>	[ 15 ]
pSP329	IncP cloning vector , Tc <sup>r</sup>	S. Porter , unpublished
pUC19	ColE1 cloning vector , Ap <sup>r</sup>	[ 16 ]
pHP45 $\Omega$ Km	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; oriColE1 , source of the $\Omega$ Km interposon	[ 17 ]
pJQ200( mp18 )	自杀质粒 Gm <sup>r</sup> , <i>sacB</i> Suicide plasmid	[ 18 ]
pPA67	pSP329 携带 Rm1021 的 <i>bdhA</i> 基因( 1.2 kb Kpn I -Hind III 片段 )	[ 9 ]
pDC16	pSP329 carrying Rm1021 <i>bdhA</i> gene( 1.2 kb Kpn I -Hind III fragment ) 从 <i>B. japonicum</i> 文库中分离到的能与 NGRPA2 互补的重组粘粒	This work
pDC19	Recombinant cosmid plasmid isolated from <i>B. japonicum</i> genomic library and can complement with NGRPA2 strain pSP329 上克隆有 pDC16 的 1 kb BamH I 片段	This work
pDC20	pSP329 carrying the 1 kb BamH I fragment of pDC16 pSP329 上克隆有 pDC16 的 14 kb BamH I 片段	This work
pDC25	pSP329 carrying the 14 kb BamH I fragment of pDC16 pSP329 上克隆有 pDC20 的约 5 kb Sac I 片段	This work
pDC28	pSP329 carrying the about 5 kb Sac I fragment of pDC20 pSP329 上克隆有 pDC20 的 9.2 kb Pst I -BamH I 片段	This work
pDC29	pSP329 carrying the 9.2 kb Pst I -BamH I fragment of pDC20 pSP329 上克隆有 pDC20 的 4.8 kb BamH I -Pst I 片段	This work
pDC32	pSP329 carrying the 4.8 kb BamH I -Pst I fragment of pDC20 pDC29 用 EcoR I 消化后 重连接	This work
pMX87	pDC29 digested with EcoR I then relegated pUC19 上克隆有 pDC29 的 3.5 kb EcoR I -Pst I 片段	This work
pMX94	pUC19 carrying the 3.5 kb EcoR I -Pst I fragment of pDC29 pUC19 上克隆有 pDC29 的 0.6 kb EcoR I 片段	This work
pMX95	pUC19 carrying the 0.6 kb EcoR I fragment of pDC29 pUC19 上克隆有 pDC29 的 0.65 kb EcoR I 片段	This work
pMX100	pUC19 carrying the 0.65 kb EcoR I fragment of pDC29 pJQ200( mp18 )上克隆有 pDC29 的 4.8 kb BamH I -Pst I 片段	This work
pMX106	pJQ200( mp18 ) carrying the 4.8 kb BamH I -Pst I fragment of pDC29 pMX100 在 <i>bdhA</i> 基因 ORF 内的 EcoR I 位点插入了 $\Omega$ Km	This work
pMX107	pMX100 inserted $\Omega$ Km at the EcoR I site within <i>bdhA</i> ORF pUC19 上克隆有 pDC29 的 1.0 kb Sal I 片段	This work
	pUC19 carrying the 1.0 kb Sal I fragment of pDC29	

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组文库的构建及 *bdhA* 基因的获得

2.1.1 *B. japonicum* USDA110 基因组文库的构建 在含 Tc 的选择平板上共获得 3 162 个带有重

组粘粒的菌落 ;随机挑取 10 个菌落 ,提取质粒 DNA ,EcoR I 酶切检查 ,各重组粘粒所带外源片段的平均大小为 12.5 kb。

2.1.2 能与 *bdhA* 突变体功能互补的克隆的获得 以 MT616 为辅助 ,通过三亲接合将 BjUSDA110 基

基因组文库分别引入 Rm11107(*bdhA1*:Tn5), 根瘤菌 NGRPA2(*bdhA1*: $\Omega$ SmSp $\lambda$ ) 将菌液涂布于以 R-HB 为唯一碳源的 M9 培养基(M9-R-HB)上, 30℃培养 5 d。结果从 NGRPA2 接合组平板上获得 12 个菌落, 而从 Rm11107 接合组平板上未得到菌落。

从 NGRPA2 接合组中提取质粒, BamHI 酶切、电泳后证实含有一重组质粒 pDC16。随后将 pDC16 引入 Rm11107 后证实能与 Rm11107 互补, 使 Rm11107 恢复利用 R-HB 作为唯一碳源的能力(即表型为 Hbu<sup>+</sup>)。

用 BamHI 酶切 pDC16 后, 获得 3 个片段, 大小分别为 23 kb、14 kb 和 1 kb。23 kb 片段经分析是载体 pLAFR1 携带部分外源片段(pLAFR1 缺少 BamHI 切点)。1 kb 和 14 kb 片段分别被克隆到 IncP 克隆载体 pSP329 上, 获得质粒 pDC19 和 pDC20。

通过接合分别将 pDC19、pDC20 引入 Rm11107 和 NGRPA2 受体菌, 只有携带 pDC20 的菌株(Rm11107/pDC20, NGRPA2/pDC20)可以利用 R-HB 作为唯一碳源而生长, 这表明 *bdhA* 基因位于质粒 pDC20 的 14 kb BamHI 片段上。

为缩小 *bdhA* 基因所在的范围(互补片段的大小), 试用多种限制性内切酶消化 pDC20(图 1)。将有关片段克隆到载体 pSP329, 所得重组质粒通过接合引入 Rm11107, 然后测定在 M9-R-HB 上的生长能力。结果, 5 kb SacI 片段(pDC25)和 4.8 kb BamHI-PstI 片段(pDC29)仍然保留与 Rm11107 互补的能力(图 2)。4.8 kb BamHI-PstI 片段是所得到的最小互补片段。pDC25 和 pDC29 作为进一步研究的材料。

## 2.2 *bdhA* 基因存在的证实

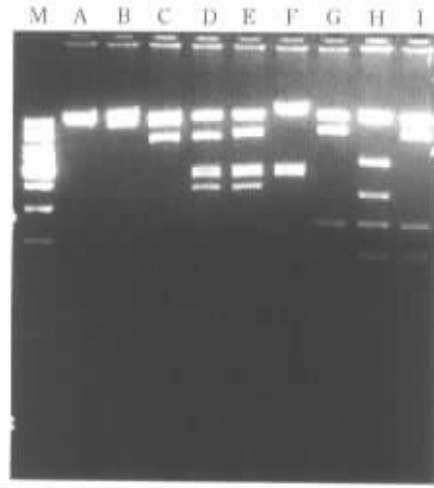
### 2.2.1 Bdh 酶活测定

pDC25、pDC29 经接合引入 *bdhA* 突变体菌株 Rm11107 后分别测定其 Bdh 活性; 结果表明, Rm11107/pDC25、Rm11107/pDC29 具有明显的 Bdh 活性(表 2), 而阴性对照 Rm11107 不具 Bdh 酶活力。

### 2.2.2 Southern Blot

以 DIG 标记的 pPA67 的 1.2 kb KpnI-HindIII 片段(携带 Rm1021 *bdhA* 基因的完整序列)<sup>[9]</sup>作为探针进行杂交, 结果显示, pDC29 的 4.8 kb BamHI-PstI 带呈阳性(图 3)。此结果进一步证明, pDC29 的 4.8 kb BamHI-PstI 片段上存在 *bdhA* 基因。

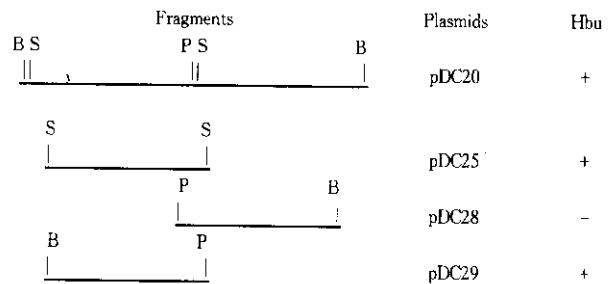
## 2.3 *bdhA* 基因序列及 Bdh 的氨基酸序列



M: 标准(1 kb ladder); A-I: pDC20 分别用 BamHI、PstI、BamHI + PstI、BamHI + PstI + SacI、SacI + BamHI、SacI、BamHI + EcoRI、BamHI + PstI + EcoRI、EcoRI 酶切  
M: Marker(1 kb ladder); A-I: pDC20 digested with BamHI, PstI, BamHI + PstI, BamHI + PstI + SacI, BamHI + SacI, SacI, BamHI + EcoRI, BamHI + PstI + EcoRI, EcoRI, respectively

图 1 pDC20 限制性酶切

Fig. 1 Restricted digestion of pDC20



B, P, S 分别代表 BamHI, PstI, SacI

B, P, S represents BamHI, PstI, SacI respectively

图 2 pDC20 的不同片段及其互补能力

Fig. 2 pDC20 fragments and their complementing abilities

表 2 Bdh 酶活测定结果

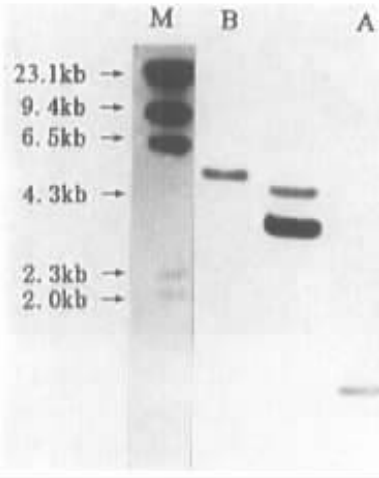
Table 2 Bdh activity assay result

菌株 Strain	Bdh 活力 nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> protein	Bdh activity
Rm11107/pDC25	32.12 ± 3.2	
Rm11107/pDC29	35.05 ± 2.9	
Rm11107	-	
Rm1021	41.32 ± 4.0	

### 2.3.1 *bdhA* 基因序列的测定

为减少测序的工作量和费用, 需进一步确定 *bdhA* 基因所在的位置; 为此对 pDC29 4.8 kb BamHI-PstI 片段试用不同的限制性内切酶消化处理并进一步亚克隆。如图 4 所示, pDC29 的 BamHI-PstI 片段上有 3 个 EcoRI

切点和 2 个 Sal I 切点。pDC29 经 EcoR I 消化后重新连接,获得了含 3.5 kb EcoR I-Pst I 片段的质粒 pDC32。

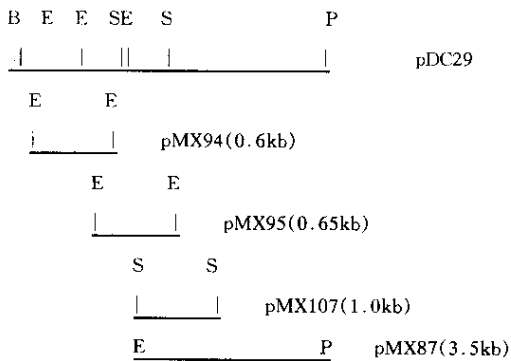


M:  $\lambda$ /Hind III; A: pPA67 用 Kpn I 和 Hind III 酶切; B: pDC29 用 BamH I 和 Pst I 酶切

M:  $\lambda$ /Hind III; A: pPA67 digested with Kpn I and Hind III; B: pDC29 digested with BamH I and Pst I

图 3 pDC29 DNA Southern 杂交图

Fig. 3 pDC29 DNA Southern blot



B, E, S, P 分别代表 BamH I, EcoR I, Sal I, Pst I

B, E, S, P stand for BamH I, EcoR I, Sal I, Pst I respectively

图 4 4.8 kb BamH I -Pst I 片段的物理图及其亚克隆

Fig. 4 Physical map and subclones of 4.8 kb BamH I -Pst I fragment

通过接合将 pDC32 引入 Rm-11107 得 Rm-11107/pDC32,划线接种于 M9-R-HB 平板上测定其 Hbu 表型。结果 Rm11107/pDC32 不能利用 R-HB 作为唯一碳源生长,即 Hbu<sup>-</sup>。酶活测定证明 Rm11107/pDC32 无 Bdh 活性。这说明 3.5 kb EcoR I-Pst I 片段中的切点 EcoR I,要么位于 *bdhA* 基因之外,要么破坏了 *bdhA* 基因的阅读框架。

根据上述结果,分别将 pDC29 上的 0.6 kb

EcoR I 片段、0.65 kb EcoR I 片段、3.5 kb EcoR I-Pst I 片段以及 1.0 kb Sal I-Sal I 片段克隆到 pUC19 载体上,分别获得 pMX94、pMX95、pMX87 和 pMX107,然后分别进行测序。

pMX95、pMX87 序列经 BLASTx 检索,分别具有 *bdhA* 部分序列,将两部分序列结合后,得到完整 *bdhA* 序列。但序列的后半部分还未得到互补链序列,为此,用软件“Primer3”设计一引物 5'cgccattc-gaagtcctactc 3',再以 pMX107 DNA 为模板进行测序,如此获得 *bdhA* 全部双链序列,见图 5。*B. japonicum* USDA110 *bdhA* 基因开放阅读框架由 789 bp 组成,GC 含量 63.6%,AT 含量 36.4%;该基因序列在 GenBank 的登记号为 AY077581。

**2.3.2 推导出的 Bdh 氨基酸序列** 推导出的 Bdh 氨基酸序列见图 5,由 262 个氨基酸残基组成,分子量 27.59 ku。比较发现其与 *Mesorhizobium loti* 的 Bdh 的相似性最高,二者都由 262 个氨基酸组成,两者间完全相同和相似的氨基酸分别达 72% 和 81%。

## 2.4 *B. japonicum* *bdhA* 突变体的构建与鉴定

**2.4.1 *B. japonicum* *bdhA* 突变体的构建** 首先将 pDC29 的 BamH I-Pst I 片段克隆到自杀质粒 pJQ200(mp18)<sup>[18]</sup> 获得 pMX100,然后用 EcoR I 对 pMX100 质粒 DNA 进行部分酶切。再与 pHP-45 $\Omega$ Km 的 EcoR I 片段(interposon)进行连接,在 LB + Gm10Km20 平板上筛选,获得 162 个克隆;随机挑取部分克隆,提取质粒 DNA,酶切、电泳检查,获得 pMX106,经多种酶切证实系在 *bdhA* 基因开放阅读框内的 EcoR I 位点正确插入了 interposon  $\Omega$ Km;  $\Omega$ Km 的插入破坏了 *bdhA* 基因的阅读框。

将 pMX106 质粒 DNA 转化感受态 S17-1 细胞,获得 S17-1/pMX106,然后与 *B. japonicum* USDA110 进行双亲接合,将接合后的菌悬液涂布于 YMA + Cm10Km40 平板上培养 6~7 d。

结果在接合组 8 个平板上共得到 626 个菌落,对照组 S17-1/pMX106 和 *B.j*USDA110 平板上均无菌落出现。

将上述菌落接于 TY + Cm10Km20 + 5% 蔗糖平板上,测定菌落在含 5% 蔗糖的培养基上的生长情况。结果约 4.8% 的被试菌落可在含 5% 蔗糖的 TY 培养基上生长。这些菌落再分别划线接种于成对的 TY + Gm30 和 TY 平板上测定其对 Gm 的敏感性;结果表明,大部分(约 76.5%)能在 TY + Cm10Km20 + 5% 蔗糖培养基上生长的菌落对 Gm

1	tctaccgcag caagaattac gaatectctg ccaaggacta tgattctcg cacgtgcca	60
61	tggtcgagca ttgggaagcc ggcgtgcgcg acgtgcactc gtcgatgcg cacaaggaca	120
121	ggctcgatca gccgcaatcc ggcgagacca tggtagccta cgatcicacg ggggacgtct	180
181	ccgcgcccc ggcaaaaagg agcgaataga <b>ATG</b> <b>AGT</b> AGT CTG TCA GGC AAG AAC GCC GTC	240
1		
	M G S L S G K N A V 10	
241	GTG ACC GGA TCG ACC AGC GGT ATC GGG CTC GCC TAT GCG CGT GCC TTC GCG GCG CCC GGT	300
31	V T G S T S G I G L A Y A R A F A A P G 30	
301	GCC AAC GTC GTC ATC AAC GGC TTC GGC TCG GCC GAG GAC ATC GAG AAG GAA CGT GCG AAG	360
31	A N V V I N G F G S A E D I E K E R A K 50	
361	ATC GAG GCG GAC TTC GGC GGG AAG GCG ATC TAC TCG CCC GCC GAC ATG ACC AAG CCG GCC	420
51	I E A D F G G K A I Y S P A D M T K P A 70	
421	GAG ATC GCC GGG ATG ATC GCG CTC GGC GAG AAG ACC TTC GGC TCG GTC GAC GTC CTC GTC	480
71	E I A G M I A L G E K T F G S V D V L V 90	
481	AAC AAT GCC GGC ATC CAG TTC GTC TCG CCG ATC GAG GAA TTC CCG CCG GAG AAA TGG GAC	540
91	N N A G I Q F V S P I E E F P P E K W D 110	
541	CAG ATC ATC GCG ATC AAC CTG TCC TCG GCC TTC CAT GCC ATT CGC GCC GCG GTG CCC GGC	600
111	Q I I A I N L S S A F H A I R A A V P G 130	
601	ATG AAG AAG AAG GGC TGG GGT CGC ATC ATC AAC ACG GCG TCG GCG CAC TCG CTG GTC GCC	660
131	M K K K G W G R I I N T A S A H S L V A 150	
661	TCG CCC TTC AAG TCG GCC TAC GTC TCG GCC AAG CAC GGC ATC GCC GGT CTT ACC AAG ACC	720
151	S P F K S A Y V S A K H G I A G L T K T 170	
721	GTG GCG CTG GAA GTC GCG ACC CAC AAG ATC ACC TGC AAC TGC ATC AGC CCC GGC TAT GTC	780
171	V A L E V A T H K I T C N C I S P G Y V 190	
781	TGG ACG CCG CTG GTC GAG AAG CAG ATC CCC GAC ACG ATG AAG GCG CGC AAT CTC ACG CGT	840
191	W T P L V E K Q I P D T M K A R N L T R 210	
841	GAC GAG GTC ATC AAC GAC GTG CTG CTC GAC GCC CAG CCG ACC AAG GAG TTC GTC ACC TCC	900
211	D E V I N D V L L D A Q P T K E F V T S 230	
901	GAG CAG GTC GCC GCA CTG GCG CTG TTC CTG TGC AGC GAC GAT GCC GCG CAG ATC ACC GGC	960
231	E Q V A A L A L F L C S D D A A Q I T G 250	
961	ACC AAC CTC TCG ATC GAC GGC GGC TGG ACG GCG <b>GAAGTAG</b> <b>gacttcgaatggcgtaggggtg</b>	1020
251	T N L S I D G G W T A E * 262	
1021	ggcaaggcgcgctccgtggccccgccatactttccgtatgfcggaaggcggtggcgcg	1080

方框 起始密码子 ; 黑体 :EcoR I 酶切位点 ; 方框带阴影 终止密码子 ; 阴影 :引物匹配区域

Square : start code ; blacken square : stop code ; boldtype : EcoR I cut site ; blacken part : sequence complementing with primer

图 5 *B. japonicum* USDA110 *bdhA* 基因序列及推导的 Bdh 氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *bdhA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*

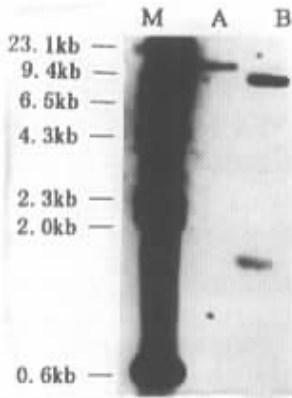
敏感。如此筛选到的对 Gm 敏感的菌株被认为是 *bdhA* 突变体,命名为菌株 Bj30064。

**2.4.2 Southern Blot 证实 *B. japonicum bdhA* 突变体** 分别制备 Bj30064 和野生菌株 BjUSDA110 的总 DNA 经 BamH I 酶切、电泳、转膜后,用 DIG 标记的 pDC29 的 4.8 kb BamH I -Pst I 片段作探针进行 Southern blot。结果 野生型 BjUSDA110 在约 14 kb 处出现 1 条阳性带,而 Bj30064 则分别于约 12.5 kb 和 1.5 kb 处出现 2 条阳性带(图 6),这可解释为 14 kb BamH I 片段被 interposon ΩKm 于 EcoR I 处打断(interposon ΩKm 也可被 BamH I 从两端切开)这与预计的结果完全相符。

**2.4.3 突变体 Bdh 酶活测定** 野生型菌株 BjUSDA110 和突变体菌株 Bj30064 分别于 YMB 中 30℃,

200 r/min 摇瓶培养 5 d,收集菌体,超声波破碎制备无细胞提取液,测定 Bdh 酶活性。结果 Bj30064 培养物的无细胞提取液未测得 Bdh 活性,而野生型菌株 BjUSDA110 测得明显的 Bdh 活性(表 3)。

**2.4.4 植株试验** 植株试验共设 3 个重复试验组,每试验组 3 个处理,分别为接种野生型菌株 BjUSDA110、接种突变体菌株 Bj30064 和不接种(以等体积 ddH<sub>2</sub>O 代替菌液);每处理 3 盆,每盆 3 株。结果,未接菌的阴性对照组的植株培养至第 18 天开始明显变黄,生长缓慢;根部无根瘤。接种 BjUSDA110 和 Bj30064 的试验组植株外观健壮,生长较快,根部明显结瘤。突变体接种组和野生型菌株接种组各测定指标统计分析未显示显著区别,而二者与阴性对照组之间差别显著(表 4)。



M:  $\lambda$ /HindIII; A: BjUSDA110 总 DNA, BamH I 酶切; B: Bj30064 总 DNA, BamH I 酶切

M:  $\lambda$ /HindIII; A: Genomic DNA of BjUSDA110 digested with BamH I; B: Genomic DNA of Bj30064 digested with BamH I

图 6 *bdhA* 突变体和野生型菌株总 DNA Southern blot

Fig. 6 Southern blot of *bdhA* mutant and wild-type strain genomic DNA

表 4 植株试验结果

Table 4 Plant test result

菌株 Strain	每株瘤数 Nodule number per plant	每株瘤重 Average weight per plant (mg)	平均单瘤重 Average weight per nodule (mg)	植株平均干重 Average shoot dry weight per plant (g)
Bj USDA110	38.80	396.70	10.22	3.625
Bj30064	34.89	379.98	10.89	3.426
CK (-)	-	-	-	0.886

克隆 *B. japonicum* 某些基因是可行的,该方法具有较好的重复性。

Aneja 和 Charles<sup>[9]</sup>报道在 *Rhizobium meliloti* 中, *bdhA* 基因和 *xdhA* 基因组成 *bdhA-xdhA* 操纵子, *xdhA* 位于 *bdhA* 的下游,与 *bdhA* 共用一个启动子。 *bdhA* 和 *xdhA* 共存的意义还不清楚,推测可能与碳饥饿和氮饥饿间的生理关联性有关。笔者分别测定了 *B. japonicum* USDA110 *bdhA* 基因的部分上游序列(0.9 kb)和下游序列(0.6 kb),均未发现 *xdhA* 基因序列的存在,说明在 *B. japonicum* 中 *bdhA* 基因并不像 *Rhizobium meliloti* 那样与 *xdhA* 基因组成操纵子。

致谢: 本文部分工作在加拿大 University of Waterloo 生物系 Trevor C. Charles 教授的实验室完成,衷心感谢 Charles 教授和该室王春霞博士的大力帮助。

## References

[ 1 ] Anderson A J, Dawes E A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Mi-*

表 3 Bdh 酶活性测定结果

Table 3 Bdh activity assay result

菌株 Strain	相关特征 Relevant characteristic	Bdh 活性 Bdh activity (nmolN $\cdot$ min $^{-1}$ $\cdot$ mg $^{-1}$ protein)
BjUSDA110	野生株 Wild strain	41.12 $\pm$ 3.6
Bj30064	<i>bdhA</i> 突变株 Mutant	-

## 3 讨论

NGRPA2 菌株系快生型根瘤菌(*Rhizobium* spp.) NGR234 的 *bdhA* 突变体(*bdhA*: $\Omega$ SmSp), *bdhA* 基因突变后,菌株不能合成 3-羟基丁酸脱氢酶,不能将 3-羟基丁酸分解成乙酰乙酸进而进入三羧酸循环代谢产能,因此不能以 R-HB 为唯一碳源而生长。利用该特性,以其为受体菌,笔者成功地从 *B. japonicum* USDA110 菌株的基因文库中克隆到 *bdhA* 基因,证明采用快生型根瘤菌突变体菌株筛选

*crobiol. Rev.* 1990, 54: 450-472.

- [ 2 ] Hirsch A M, Long S R, Bang M, Haskins N, Ausubel F M. Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 1982, 151: 411-419.
- [ 3 ] Paau A S, Bloch C B, Brill W J. Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacterioids in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 1980, 143: 1480-1490.
- [ 4 ] Wong P P, Evans H J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate utilization by soybean nodules and assessment of its roles in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 1971, 47: 750-755.
- [ 5 ] Bergersen F J, Peoples M B, Turner G L. A role for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in bacterioids of soybean root nodules. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.* 1991, B245: 59-64.
- [ 6 ] Gerson T, Patel J J, Wong M N. The effects of age, darkness and nitrate on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate levels and nitrogen-fixing ability of *Rhizobium* in *Lupinus angustifolius*. *Physiol. Plant.* 1978, 42: 420-424.
- [ 7 ] Klucas R V. Studies on soybean nodules senescence. *Plant Physiol.* 1975, 54: 612-616.
- [ 8 ] Charles T C, Cai G Q, Aneja P. Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Genetics*, 1997, 146: 211-220.

- [ 9 ] Aneja P , Charles T C . Poly-3-hydroxybutyrate degradation in *Rhizobium* ( *Sinorhizobium* ) *meliloti* : Isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 1999 , 181 : 849 - 857 .
- [ 10 ] Fottrell P F , Hora AO' . Multiple forms of D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 1969 , 57 : 287 - 292 .
- [ 11 ] Simon R , Priefer U , Puhler A . A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* , 1983 , 1 : 784 - 791 .
- [ 12 ] Finan T M , Kunkel M B , Devos G F , Signer E R . Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* 1986 , 167 : 66 - 72 .
- [ 13 ] Meade H M , Long S R , Ruvkun G B , Brown S E , Ausubel F M . Physical and genetic characterization of *Rhizobium meliloti* induced by transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 1982 , 149 : 114 - 122 .
- [ 14 ] Trinick M . Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus* , *Leucaena leucacephala* , *Mimosa* spp. *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* 1980 , 49 : 39 - 53 .
- [ 15 ] Friedman A M , Long S R , Brown S E , Buikema W J , Ausubel F M . Construction of a broad host range cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* , 1982 , 18 : 289 - 296 .
- [ 16 ] Yanisch-Perron C , Vieira J , Messing J . Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* , 1985 , 33 : 103 - 119 .
- [ 17 ] Fellay R , Frey J , Krisch H . Interposon mutagenesis of soil and water bacteria : a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* , 1987 , 52 : 147 - 154 .
- [ 18 ] Quandt J , Hynes M F . Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* , 1993 , 127 : 15 - 21 .
- [ 19 ] Miller J H . *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , N. Y. 1972 .
- [ 20 ] Maniatis T , Fritsch E F , Sambrook T . *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory , Cold Spring Harbor , N. Y. 1982 .
- [ 21 ] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E , Moore D D , Seidman J G , Smith J A , Struhl K . *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons , New York , N. Y. 1997 .
- [ 22 ] Bergmeyer H U , Gawehn K , Klotzsch H , Krebs H A , Williamson D H . Purification and properties of crystalline 3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.* 1967 , 102 : 423 - 431 .
- [ 23 ] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 , 72 : 248 - 254 .

(责任编辑 孙雷心)