

马铃薯青枯细菌基因文库构建 研究及胞外多糖基因克隆

康耀卫 毛国璋 何礼远

(中国农科院植物保护研究所 北京 100094)

1 前言

植物细菌性青枯病 (*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) 是一种重大的细菌性病害, 在我国每年都可以造成很大损失。长期以来对此病害缺乏有效的防治办法, 其原因之一是对其致病机制还没有本质的了解。构建基因文库是分析克隆病原细菌与致病性有关的基因重研究病原菌同寄主植物相互作用机制的重要基础。本研究先用我国马铃薯优势小种 3 号为材料, 以具有广寄主范围转移柯式质粒 PLA2917 为载体, 构建了马铃薯青枯菌的基因文库, 并从中克隆了青枯菌胞外多糖的基因, 为进一步研究青枯菌的致病基因奠定了基础。

2 材料与amp;方法

菌株和质粒的特征及来源见表 1。

2.1 试剂和缓冲液

限制性内切酶 BglII, Sau3A, EcoRI, BmHI, HindIII, RNA 消解酶, T₄ 连接酶, 噬菌体外壳蛋白物来源于 Biolab, 蛋白酶 K, 溶菌酶, 碱性磷酸酶, 氯化铯, 低熔点琼脂糖和 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵) 是华美生物工程公司进口产品, 其它试剂均为国产分析纯。

2.2 培养基和抗生素

植物青枯菌于牛肉汁液体或固体培养基 (0.3% 牛肉膏, 0.5% 蛋白胨, 1% 葡萄糖, 0.05% 酵母膏) 在 30℃ 条件下培养, 大肠杆菌采用 LB 液体或固体 (1% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏, 1% NaCl) 培养基在 37℃ 条件下培养, 需要时卡那霉素用量为 50μg/ml, 四环素 40μg/ml。用于基因文库保存的 Hogness 培养液成分为 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏, 0.5% NaCl, 8.8% 甘油, 3mM 乙酸钠, 5mM K₂HPO₄, 26mM KH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 15mM (NH₄)₂SO₄。用于基因互补试验的培养基为基本培养基 MM。

2.3 总体 DNA 的提取

100ml 生长 48 小时的青枯菌株 PO₄₁ 在 4000g 离心 10 分钟, 菌体细胞悬浮在 9.5ml TE 缓冲液中, 加入 0.5ml 10% SDS 和 50μl 20mg/ml 蛋白酶 K 在 37℃ 条件下反应 1 小时。加入 1.8ml 5M NaCl 和 1.5ml CTAB/NaCl (10% CTAB 于 0.7M NaCl 中) 在 65℃ 下反应 20 分钟。然后采用苯酚: 氯仿除去蛋白, 最后用异丙醇沉淀 DNA。DNA 溶解 TE 缓冲液后, 于 4℃ 条件下透析 48 小时。

2.4 柯式质粒 PLA2917 的提纯

生长 12 小时的大肠杆菌 S₁₇₋₁ (含 PLA2917) 经溶菌酶、Triton X-100 裂解

后, 采用 PEG-6000 沉淀 DNA, 在 Beckman VTi 65-1 进行超速离心 5 小时, 用 13 号针头把下层的质粒带取出, 经正丁醇除去溴化乙锭, 经 TE 缓冲液透析过的质粒 DNA 即可用于酶切。

2.5 20~30kb 长度 DNA 片段的制备

参考了 Maniantis 等标准方法建立内切

酶 *Sau3A* 部分水解 DNA 成 20~30kb 的最佳反应条件, 依照此反应条件水解 100~150 μ g 的总体 DNA, 反应结束后用苯酚及氯仿进行抽提并用异丙醇沉淀 DNA, 最后溶于 200 μ l TE 缓冲液中。这些样品在 4 $^{\circ}$ C 条件下经过 0.4% 低熔点琼脂糖凝胶电泳过夜分离, 回收 20~30kb 的 DNA 片段。

表 1 菌株与质粒的来源和特征

菌株及质粒	特 征	来 源
PO ₄₁	马铃薯野生型青枯菌株生理小种 3 号	本实验室
E ₁ , E ₄ , E ₇ , E ₁₆	Tn5 诱变 PO ₄₁ 后获得的胞外多糖缺失突变株	本实验室
S ₁₇₋₁	大肠杆菌 Pro, res ⁻ mod ⁺ , hsdR ⁻ , hsdM ⁺ , recA, RP ₄₋₂ (Tc::Mu)(Km::Tn7)	澳大利亚莫纳石大学
PLA2917	柯式质粒 Km ⁺ Tc ⁺ , 编码 Km 区域具有单一的限制性内切酶 BglII 酶切位点	澳大利亚莫纳石大学
p ²⁻³⁶ , p ⁹⁻⁴⁵ 等	插有外源 DNA 片段的质粒 PLA2917	本实验室

2.6 载体的制备

用过量的内切酶 BglII 完全水解大约 20 μ g 的 PLA2917 后, 采用苯酚、氯仿抽提水解后的样品除去和失活内切酶 BglII, 并用乙醇沉淀 DNA, 溶解于 200 μ l TE 缓冲液中, 再用碱性磷酸纯化其粘性末端。

2.7 连接和包装

取制备好的 1.5 μ g 质粒载体 PLA2917 同 0.5 μ g 20~30kb 片段总体 DNA 混合, 加入 T₄ 连接酶及缓冲液, 使最后的总体积为 10 μ l, 在 12 $^{\circ}$ C 条件下反应过夜, 加 3 μ l 上述反应液于一个标准的人外蛋白壳混合物中, 在 22 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 再加入 0.5ml TNM 缓冲液 (0.1M NaCl, 0.01M Tris, 0.01 MgSO₄) 和 1 滴氯仿。

2.8 侵染与保存

包装后的反应物 10 μ l, 加入 0.1ml TNM 和 0.2ml 生长在含有 0.2% 麦芽糖 LB 液体培养基的大肠杆菌 S₁₇₋₁, 在 37 $^{\circ}$ C 下作用 20 分钟后, 加入 1ml LB 液体培养液, 37 $^{\circ}$ C 下作用 45 分钟, 最后在含有

四环素的 LB 平板培养基上涂布, 挑取单个菌落, 进一步测定对卡那霉素的敏感性, 从中筛选出对卡那霉素敏感的并抗四环素的克隆, 保存在 96 孔细胞培养板上。

2.9 胞外多糖基因克隆的筛选

取 0.2ml 3 $\times 10^9$ cells/ml 青枯菌胞外多糖缺失突变株的菌悬液, 均匀涂在含四环素的 MM 平板上, 然后采用影印法分别以每皿 50 个柯式质粒克隆影印在上述 MM 平板上, 30 $^{\circ}$ C 下培养 3~5 天, 观察胞外多糖产生情况。

3 试验结果

3.1 马铃薯青枯菌 PO₄₁ 总体 DNA 20~30kb 片段的制备

100 μ g 的总体 DNA 经过 12u 单位的 *Sau3A* 水解 1 小时, 完全可以得到大部分 25kb 的 DNA 片段。结果见图 1。

3.2 载体的制备

20 μ g 的 PLA2917 经 80 μ 的 BglII

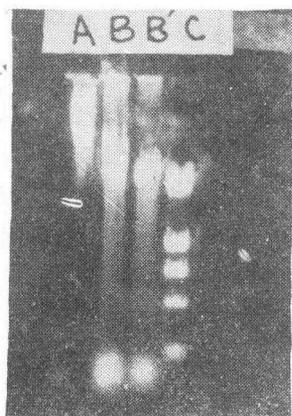


图 1 25kb 的 DNA 片断

- A: λDNA, 50kb;
- B: 12 单位 Sau3A 酶解青枯菌总体 DNA 45 分钟;
- B': 12 单位 Sau3A 酶解青枯菌总体 DNA 1 小时;
- C: HindIII 酶切入 DNA.

酶切后, 经电泳只出现一条大约为 20kb 带, 而对照未经 BglII 酶切的 PLA2917 由于构象不同则出现了 2 条带。线性的 PLA2917 经 200μ 的碱性磷酸酶处理后, 不能自身连接成环, 结果表明试验所制备的载体是符合构建基因文库的要求的。

3.3 连接与包装

制备好的外源 DNA 片段同载体质粒混合后, 在 T₄ 连接酶的作用下, 就可以把外源 DNA 连接到载体质粒上, 得到一个大约为 45kb 左右的重组质粒, 这样大小的重组质粒是具备被人外壳蛋白包装的条件的, 而过分大于或小于 20~30kb DNA 片段虽然有可能被连接于载体上, 但这样的重组质粒是不可能被人外壳蛋白所包装的, 也就不具备侵染大肠杆菌的能力, 因此在侵染大肠杆菌后, 会被自然淘汰掉。但也有一种可能是两个载体质粒被连接酶连接后, 成为一个 40kb 左右的重组二聚体质粒, 它有可能被人外壳蛋白包装后侵染大肠杆菌。但是这样的重组质粒由于没有外源 DNA 的插入, 其对卡那霉素的抗失就不会丧失, 经过在含有卡那霉素的平板上筛选, 就可以去掉这一部分克隆。

3.4 筛选青枯菌胞外多糖的基因克隆

通过基因互补试验, 从青枯菌的基因文库中筛选出了多个克隆, 可以使青枯菌的胞外多糖缺失突变株恢复产生胞外多糖的能力, 这表明这些基因克隆所包含有的外源

表 2 柯式质粒克隆互补胞外多糖缺失突变株恢复产生胞外多糖的情况

重组柯式质粒	胞外多糖缺失突变株			
	E ₁	E ₄	E ₇	E ₁₆
p ⁹⁻⁴⁵	+	+	-	-
p ³³	+	-	-	-
p ³⁻⁵	+	-	-	-
p ⁹⁻¹³	-	-	+	+
p ¹⁰⁻¹⁷	-	-	+	+
p ³⁻⁴⁴	-	-	+	+
p ³¹⁻⁴³	-	-	-	+
p ⁴⁻⁴⁰	-	-	-	+
p ²⁻³⁶	-	-	+	+
p ²¹⁻³⁵	-	-	-	+
p ⁷⁻⁷	-	+	-	-
p ³⁷⁻¹⁶	-	+	-	-
p ³¹⁻¹⁴	-	+	-	-

注: +代表产生胞外多糖; -代表不产生胞外多糖



膨大素在马铃薯上的应用

王春珍 李荫藩 樊民夫 丰秀珍 杨如达

(山西省农科院高寒区作物研究所 大同 037004)

膨大素是一种植物生长调节剂的复配剂,它能提高马铃薯光合效率,可将较多的光合产物运送到马铃薯块茎内,提高经济系数。近年来,江苏、四川、云南等省在甘薯上应用面积较大。1988年山西省开始引进并在马铃薯上应用,我们于1989年和1990年两年在山西省广灵县、浑源县进行了试验示范,增产效果较好,一般增产10%以上,大薯率提高5%以上。

现将试验总结如下。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试品种晋薯2号,膨大素由山西农科院玉米研究所提供。

1.2 试验设计

试验在广灵县曹庄村马铃薯基点进行,土壤质地为沙壤,肥力中等,前茬作物为黍子。试验小区面积0.02亩,重复3次,随机排列,分以下两组处理。

DNA片段是青枯菌控制产生胞外多糖的基因。结果见表2。

恢复产生胞外多糖的能力,这说明青枯菌的胞外多糖的产生是由多个基因控制的。

4 讨论

若以大肠杆菌染色体DNA的长度 3×10^6 bp来假设为青枯菌PO₄₁基因组的长度,由于柯式质粒PLA2917插入外源DNA的片段是25(即 2.5×10^4 bp),依据
$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$
可以计算出在基因文库中能代表青枯菌99%的染色体所需要的重组数为 $N = 5.503 \times 10^2$,因此本试验所挑取的2000个克隆是可以包含青枯菌的99%染色体信息的。

从表2的结果可以看到,没有任何一个克隆可以互补所有供试胞外多糖缺失突变株

参 考 文 献

- 1 何礼远、华静月、张长龄. 我国细菌性青枯病发生及防治. 植物保护, 1983, 9 (3) : 8~10
- 2 吴鹤龄、林锦湖. 遗传学实验方法和技术. 高等教育出版社, 1983
- 3 Holmes O S and Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal Biochem, 1981 11(4) : 193~197
- 4 Maniatis et al. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor N Y. 1982
- 5) Murray M G and Thompson W F. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucl Acids Res. 1980, 8 : 4321~4352
- 6 Bray R D et al. Isolation and characterization of *P. putida* R-prime plasmids. J Gen Microbiol, 1987, 133 : 683~690