

利用 Tn5-1063 转座诱变法分离苜蓿中华根瘤菌 042BM *noeB* 基因的研究

杜秉海 李小红 林榕姗 王 磊 杨苏声*

(中国农业大学生物学院微生物学系 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室 北京 100094)

摘 要 采用三亲本杂交方法将带有 Tn5-1063(含 *luxAB*) 的质粒 pRL1063a 导入苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 042BM , 进行转座子插入诱变 , 在含有氯霉素、卡那霉素的 TY 平板上筛选接合子。通过结瘤试验 , 从 1000 个突变株中 , 筛选到 3 个结瘤突变株 042BMR5、042BMR11 和 042BRM29。它们都表现出发光酶活性 , 表明转座子正向插入到基因组中的某个启动子下游。Southern 杂交结果证实 , 转座子均为单一位点插入。对 042BMR5 突变株基因组进行反向 PCR 扩增位于 Tn5-1063 两端的侧翼序列。测序结果表明 , 转座子插入到苜蓿中华根瘤菌的共生质粒 pSymA *noeB* 基因内。根据基因组中 *noeB* 上游和下游序列扩增出 042BM *noeB* , 其与苜蓿中华根瘤菌 1021 *noeB* 的同源性为 98% , 而与 NoeB 蛋白的氨基酸序列相似性为 95%。疏水性分析发现 , NoeB 是一个跨膜蛋白 , 在 N 末端有 4 个跨膜区 , 其中包含 3 个初级螺旋和 1 个次级螺旋。

关键词 : *Sinorhizobium meliloti* , 结瘤基因 , 发光酶活性 , Tn5-1063

中图分类号 : Q933 **文献标识码** : A **文章编号** : 0001-6209(2004) 02-0206-04

根瘤菌与豆科植物之间的共生作用是由植物和根瘤菌多个基因所决定的 , 是一个十分复杂的生物学过程。在苜蓿中华根瘤菌中 , 已经鉴定出 20 多个结瘤基因(*nod*、*nol* 和 *noe*) 除 *nodP2* 和 *nodQ2* 存在于 pSymB 上以外 , 其它结瘤基因均位于 1.35Mb 的共生质粒 pSymA 上 , 在 275kb 的 DNA 片段内组成 6 个操纵子。结瘤基因主要编码结瘤因子生物合成过程中所需的酶和转录调节物 , 如共同结瘤基因 *nodABC* 在结构上是保守的 , 存在于所有根瘤菌中 , 主要负责结瘤因子核心糖骨架的合成 ; 宿主专一性结瘤基因 *nodM*、*nodN*、*nodFEG*、*nodH* 和 *nodPQ* 等主要负责结瘤因子的糖骨架侧链基团的添加 ; 结瘤调节基因 *nodD1*、*nodD2* 和 *nodD3* 编码转录调节蛋白 , 其中 , *nodD1* 和 *nodD2* 与植物结瘤信号分子类黄酮共同作用 , 激活 *nod* 操纵子的转录表达。 *syrM* 和 *syrB* 也是调节蛋白基因 , 与 *nodD3* 组成一个调控系统 , 参与上述操纵子的转录调节^[1~4]。此外 , *nolFGHI*、*nolQS* 和 *noeAB* 等与结瘤有关的基因的功能大多尚不清楚 , 可能与物质的运载有关。胞外多糖对于根瘤菌 - 植物共生相互作用也是至关重要的 , 苜蓿中华根瘤菌分泌 3 种有关的胞外多糖 , 即琥珀酰葡聚糖(EPS I)、半乳糖葡聚糖(EPS II) 和 K 抗

原(KPS)。EPS I 的生物合成由 *exo*、*exs* 基因所控制 , 而 EPS II 的生物合成由 *exp* 基因所控制 , 它们均位于共生质粒 pSymB 上^[5]。

利用转座子 Tn5 及其衍生物对原核生物进行转座诱变 , 已广泛用于基因的鉴定、定位、定向和克隆。Tn5 能够在许多革兰氏阴性细菌基因组中进行随机、单位点的插入 , 可以用 Tn5 末端序列设计引物进行 PCR 扩增插入位点的侧翼序列^[6,7] , 或直接进行测序^[8,9]等。本文利用含发光酶基因 *luxAB* 的 Tn5-1063 对苜蓿中华根瘤菌 042BM 进行转座诱变 , 筛选结瘤突变株 , 并进行了相关基因的分离与分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验采用的菌株和质粒参见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristic	Source
<i>S. meliloti</i> 042BM	Forming nodules on alfalfa	This laboratory
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for plasmids	This laboratory
pRL1063a	Carrying Tn5- <i>luxAB</i> , Km ^r , Sm ^r	University of York , UK
pRK2013	Helper plasmid , Km ^r	This laboratory
pGEM-T easy	Cloning and sequencing vector , Amp ^r	Promega

基金项目 : 国家 973 项目 (001CB108905)、欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10056)资助

* 通讯作者。Tel 86-10-62892674 Fax 86-10-62891332 E-mail : yangssh@cau.edu.cn

作者简介 : 杜秉海(1963 -) 男 , 山东人 , 理学博士 , 主要从事分子微生物学的研究。

收稿日期 : 2003-07-08 , 修回日期 : 2003-12-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 酶和生化试剂

Taq DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、PCR 其它试剂、*Cla* I、DNA 胶内回收试剂盒和抗生素等均购自上海生工生物工程技术有限公司，T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。引物的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 培养基和培养条件

042BM 及相关突变株采用 TY 培养基^[10]，在 28℃ 下培养。*E. coli* 菌株采用 LB 培养基^[11]，在 37℃ 下培养。抗生素所用终浓度 042BM 为 5μg/mL 氯霉素 (Cm)，突变株为 5μg/mL 氯霉素和 20μg/mL 卡那霉素 (Km)，大肠杆菌为 20μg/mL 卡那霉素。

1.4 Tn5-1063 插入诱变

将供体菌 *E. coli* DH5α (pRL1063a) 和辅助菌 *E. coli* DH5α (pRK2013) 分别接种于含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中过夜培养，取出 0.5mL 菌液继续培养 3~4h，至 OD 值为 1.0 左右。将受体菌 042BM 接种于含 5μg/mL 氯霉素的 TY 液体培养基中，以 170r/min 振荡培养 40h，至 OD 值为 1.5 左右。将供体菌、辅助菌、受体菌按 2:2:1 比例混合，12000r/min 离心 5min，将菌泥转移到含 5μg/mL 氯霉素和 20μg/mL 卡那霉素的 TY 平板上的微孔滤膜上，于 28℃ 培养 20h。将膜上的菌体用无菌水洗下，涂布在含氯霉素和卡那霉素的 TY 抗性平板上，于 28℃ 培养 2~3d，挑选单菌落保存在 TY 斜面上。

1.5 结瘤相关突变株的筛选

采用双层瓶法^[12]进行结瘤试验，将 042BM 的 Tn5-1063 插入突变株培养物分别接种于苜蓿上，在温室培养 30d 后，观察结瘤情况。

1.6 发光酶活性的检测

按葵醛熏蒸法进行^[7]。

1.7 DNA 分离和遗传操作

质粒 DNA 按碱裂解法^[13]进行；苜蓿中华根瘤菌总 DNA 的提取参照文献[14]；DNA 的限制性酶切、连接和 Southern 杂交按文献[11]进行；DNA 探针的标记和杂交检测按 Roche 公司生产的地高辛试剂盒 (产品编号为 1745832) 说明书进行。

1.8 Tn5-1063 对目标基因的克隆

参照文献[6]和[7]的方法，采用 *Cla* I 对苜蓿中华根瘤菌总 DNA 进行完全消化，然后加热灭活 *Cla* I，加入 T4 DNA 连接酶，使 DNA 进行自连。再将 DNA 自连产物重悬于无菌双蒸水中。根据 Tn5-1063 的末端反向重复序列，设计寡核苷酸引物 5'-GGTTCGGTTCAGGACGCTAC-3'。建立以下反应体系

(100μL): 1 × *Taq* 酶缓冲液，200μmol/L dNTP，1.5mmol/L MgCl₂，2μmol/L 引物，200~500 ng DNA 自连产物，2.2U *Taq* DNA 聚合酶。反应条件：94℃ 4min；94℃ 1min 55℃ 2min，72℃ 4min，35 次循环。根据苜蓿中华根瘤菌基因组中目的基因的上下游序列设计引物，扩增完整的目的基因。

1.9 DNA 序列的测定和分析

采用琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物，克隆到 pGEM-T easy 载体上，序列的测定由上海博亚生物技术有限公司完成，并通过 GenBank 进行序列同源性和功能分析。

2 结果

2.1 结瘤突变株的获得

利用 Tn5-1063 对 042BM 进行随机插入诱变，获得了 1000 个突变株。通过结瘤试验，从中筛选出 3 个结瘤突变株，分别定名为 042BMR5、042BMR11 和 042BMR29。它们的结瘤数没有明显改变，但根瘤重和植株干重有不同程度的变化，而且表现出品种专一性 (表 2)。042BMR5、042BMR11 和 042BMR29 在普通紫花苜蓿形成根瘤的重量分别比野生型菌株提高了 19.3%、20.7% 和 27.7%。在保定苜蓿上，它们的植株干重分别提高 27.5%、33.0% 和 14.0%。而在皇后苜蓿上均表现出植株干重的降低。

表 2 042BM 及其转座子插入突变株在不同苜蓿品种上的结瘤固氮能力

Table 2 Nodulation of 042BM and its Tn5-1063 insertion mutants on alfalfa

Cultivar	Strain	Number of nodule	Weight of nodule /mg	Weight of top dry plant/mg
Putong-Zihua	042BM	4.45	6.0	29.0
	042BMR5	4.35	9.7	34.6
	042BMR11	4.28	10.0	35.0
	042BMR29	3.83	9.9	37.0
Huang-Hou	042BM	4.47	6.0	37.9
	042BMR5	4.84	7.9	37.0
	042BMR11	5.03	8.5	37.1
	042BMR29	4.23	7.7	37.6
Bao-Ding	042BM	3.25	2.2	20.0
	042BMR5	3.60	5.1	25.5
	042BMR11	2.75	4.7	27.6
	042BMR29	3.45	5.0	22.8

Triplicates were done for each treatment, values in the table are the means of 30 plants.

利用葵醛熏蒸法检测上述 3 个突变株的发光酶活性，结果表明它们在 TY 平板上都能够发光，说明 Tn5-1063 正向插入到目的基因的启动子下游 (图 1)。用转座子上没有酶切位点的 *Cla* I 对上述突变

株的基因组 DNA 进行完全酶切,以 pRL1063a 的 *luxAB* 片段作探针,进行 Southern 杂交分析,发现它们都只有一条清晰的杂交带(图 2),说明 Tn5-1063 是以随机和单一位点方式插入的。

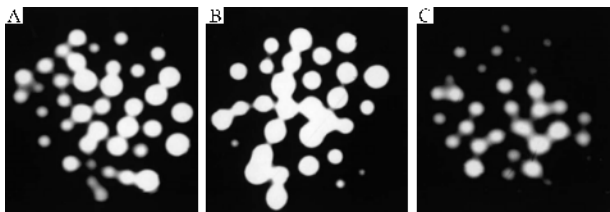


图 1 042BM Tn5-1063 插入突变株的发光酶活性的 X 光图片

Fig.1 X-ray films of luciferase activity in 042BM Tn5-1063 insertion mutants
A. 042BMR5 ; B. 042BMR11 ; C. 042BMR29.

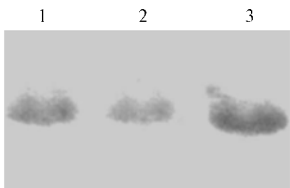


图 2 042BM 结瘤突变株基因组 DNA 经 *Cla* I 酶切后与 *luxAB* 探针的 Southern 杂交图谱

Fig.2 Southern hybridization of 042BM mutants genomic DNA digested by *Cla* I with *luxAB* probe
1. 042BMR11 ; 2. 042BMR5 ; 3. 042BMR29.

2.2 042BMR5 基因组的 Tn5-1063 侧翼 DNA 片段的分离和序列分析

提取 042BMR5 的总 DNA,用 *Cla* I 进行完全酶切,酶切后的 DNA 片段进行自连。以自连后的产物作为模板,进行 PCR 扩增,将获得的 PCR 产物连接到 pGEM-T easy 载体上,进行序列测定。由于苜蓿中华根瘤菌 1021 的基因组全序列已经被测定^[1],将本测序结果进行互联网的全基因组检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。结果表明,Tn5-1063 插入到苜蓿中华根瘤菌 *noeB* 基因的第 1331 碱基(T)之前。该基因是一个结瘤基因,位于共生质粒 pSymA 的 420721~422382bp 之间,与上游的结瘤基因 *noeA* 和 *nodL* 组成一个受 *nod box* n5 控制的操纵子。

根据 *noeB* 上游和下游的序列设计引物,通过高保真 PCR 扩增,获得 042BM 的 *noeB* (GenBank Accession No. AY463102),大小为 1662bp,编码 553 个氨基酸。根据 DNA 序列分析,042BM 的 *noeB* 与 1021 的 *noeB* 同源性达 98%。对由 DNA 序列衍生的氨基酸序列在 GenBank 的蛋白质库中进行比较,其 NoeB 氨基酸序列相似性为 95%。对 NoeB 氨基酸序列进行疏水性分析([http://sosui.proteome.bio.tuat.](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp)

[ac.jp](http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp)),发现该蛋白是一个跨膜蛋白。跨膜区位于 N-末端第 4 与第 126 位氨基酸之间,由 4 个跨膜区组成,包括 3 个初级螺旋和 1 个次级螺旋(表 3)。

表 3 042BM NoeB 的跨膜区位置和类型

Table 3 Transmembrane region of 042BM NoeB					
No.	N terminal	Transmembrane region	C terminal	Type	Length
1	4	IVLLSPLVILLSPHDAFGVY	26	Primary	23
2	34	GYAVIACVAIIGLALGMIAIFCY	56	Primary	23
3	60	AVGNVVTAGTILAVTILFLFGDLSY	82	Secondary	23
4	104	GLVVLLILFLKLMMAVPRMMAAF	126	Primary	23

3 讨论

利用 Tn5-1063 对苜蓿中华根瘤菌 042BM 进行转座诱变,筛选结瘤突变株,进而分离相关基因的方法是行之有效的。本实验获得了 3 个结瘤突变株 042BMR5、042BMR11 和 042BMR29,其结瘤固氮能力都有不同程度的改变。上述突变株于萘醛熏蒸下在平板上都可以发光,由于 Tn5-1063 的 *luxAB* 基因没有自身的启动子,说明 Tn5-1063 正向插入于 042BM 基因组中启动子的下游。对 042BMR5 的基因组进行反向 PCR 扩增和测序研究表明,Tn5-1063 的单位点插入该菌株的 *noeB* 基因中。Tn5-1063 的插入并未导致结瘤数的明显改变,但根瘤重和植株干重有不同程度的改变,而且表现出明显的品种特异性。在所测试的苜蓿品种中,除皇后苜蓿的植株干重有所下降外,普通紫花、保定的植株干重都有大幅度的提高。对 NoeB 进行蛋白结构分析发现,NoeB 是一个跨膜蛋白。Ardourel 等^[15]认为,NoeB 与已知的运输蛋白没有同源性,而且 *noeB* 与其它结瘤基因的作用不同,虽然是苜蓿结瘤所需的宿主专一性基因,但是与结瘤因子的形成和分泌无关。我们由此设想,*noeB* 可能通过一个未知的新的作用机制影响共生固氮能力。具体功能有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Galibert F, Finan T M, Long S R, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 2001, **293** (5530) : 668 – 672.

[2] Barnett M J, Fisher R F, Jones T, et al. Nucleotide sequence and predicated function of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(17) : 9883 – 9888.

[3] Finan T M, Weidner S, Wong K, et al. The complete sequence of the 1 683-Kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(17) : 9889 – 9894.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Capela D , Barloy-Hubler F , Gouzy J , *et al.* Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2001 , **98** (17) : 9877 – 9882.
- [5] Pellock B J , Cheng H P , Walker G C. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol* , 2000 , **182** (15) : 4310 – 4318.
- [6] Rich J J , Willis D K. A single oligonucleotide can be used to rapidly isolate DNA sequences flanking a transposon Tn5 insertion by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* , 1990 , **18** (22) : 6673 – 6676.
- [7] Wolk C P , Cai Y , Panoff J M. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1991 , **88** (12) : 5355 – 5359.
- [8] Milcamps A , Ragatz D M , Lim P , *et al.* Isolation of carbon- and nitrogen-deprivation-induced loci of *Sinorhizobium meliloti* 1021 by Tn5-*luxAB* mutagenesis. *Microbiology* , 1998 , **144** (11) : 3205 – 3218.
- [9] Marits R , Kõiv V , Laasik E , *et al.* Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology* , 1999 , **145** (8) : 1959 – 1966.
- [10] Honeycutt R J , McClland M , Sobral B W. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* , 1993 , **175** (21) : 6945 – 6952.
- [11] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , 908.
- [12] Vincent J M. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications , Oxford , 1970 , 164.
- [13] Kragelund L , Christoffersen B , Nybroe O , *et al.* Isolation of *lux* reporter gene fusions in *Pseudomonas fluorescens* DF57 inducible by nitrogen or phosphorus starvation. *FEMS Microbiol Ecol* , 1995 : **17** (2) : 95 – 106.
- [14] de Bruijn F J , Rossbach S , Schneider M , *et al.* *Rhizobium meliloti* has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* , 1989 , **171** (3) : 1673 – 1682.
- [15] Ardourel M , Lortet G , Maillet F , *et al.* In *Rhizobium meliloti* , the operon associated with the *nod* box n5 comprises *nodL* , *noeA* and *noeB* , three host-range genes specifically required for the nodulation of particular *Medicago* species. *Mol Microbiol* , 1995 , **17** (4) : 687 – 699.

Study on Isolation of *noeB* of *Sinorhizobium meliloti* 042BM by Tn5-1063 Mutagenesis

DU Bing-Hai LI Xiao-Hong LIN Rong-Shan WANG Lei YANG Su-Sheng*

(Department of Microbiology , College of Biological Sciences , China Agricultural University ,

Key Laboratory for Agro-Microbial Resources and Application of Agriculture Ministry , Beijing 100094 , China)

Abstract : The Tn5-1063 containing promoterless *luxAB* genes was used to mutagenize *S. meliloti* 042BM and 1000 insertion mutants were subsequently screened for nodulation mutants. Three mutants involved in nodulation were obtained , named as 042BMR5 , 042BMR11 and 042BM29 , respectively . All of them showed some changes of ability in symbiosis . Further , their luciferase activities were determined in TY media . It is indicated that Tn5-1063 was inserted directly into loci downstream of promoters in 042BM genome . DNA sequences flanking Tn5-1063 of 042BMR5 was amplified using inverse PCR , and it was found that Tn5-1063 was inserted into *noeB* gene . The *noeB* of 042BM is identical to that of *S. meliloti* 1021 at 98% level , and similarity of amino acid sequences of their NoeB was 95% . Hydrophobicity analysis of the NoeB showed that it is a transmembrane protein and includes four transmembrane regions at N-terminal , consisting of three primary helixes and one secondary helix .

Key words : *Sinorhizobium meliloti* , *noeB* gene , Luciferase activity , Tn5-1063

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (001CB108905) ; European Commission INCO-DC Program (ICA4-CT-2001-10056)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62892674 ; Fax : 86-10-62891332 ; E-mail : yangssh@cau.edu.cn

Received date : 07-08-2003