

华癸根瘤菌中自体诱导物的初步研究

高轶静 钟增涛 郑会明 王 卉 朱 军*

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 群体感应 (Quorum sensing) 是细菌通过产生可扩散的小分子量自体诱导物信号分子感知细胞群体密度变化, 进行基因表达调控的生理行为。将根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 构建为超量表达群体感应调节蛋白 TraR 的检测菌株 JZA1, 试验证明该检测菌株能检测纳摩尔浓度的自体诱导物, 利用该菌株对 3 株不同华癸根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 进行自体诱导物活性检测, 发现该 3 株华癸根瘤菌均能产生自体诱导物, 其表达量与菌体密度成正相关, 但 3 株菌在相同培养条件下自体诱导物的表达量存在差异, 结果表明自体诱导物在种内水平上存在一定的多样性, 同时发现高 pH 条件能大大降低自体诱导物的稳定性, 为进一步研究群体感应调节在共生固氮上的作用提供理论及实践依据。

关键词 群体感应, 自体诱导物, 华癸根瘤菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)01-0019-04

近来, 单细胞细菌通过产生可扩散的小分子量信号分子用于细胞间的通讯已经得到公认, 这一现象被称为“群体感应”(Quorum sensing)^[1,2]。群体感应是细菌根据细胞密度变化进行基因表达调控的一种生理行为, 具有群体感应的细菌能产生并释放称为自体诱导物 (Autoinducer, AI) 的信号分子, 它随着细胞密度的增加而增加, 当积累到一定阈值时可与调控蛋白结合从而启动细菌中特定基因的表达^[3]。高丝氨酸内酯类 (*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs) 信号分子调节细菌基因的表达是细菌细胞间通讯最具代表性的例子^[1]。细菌细胞通过群体感应与周围环境进行信息交流, 从而改变其生理活性, 如共生、细菌毒性、竞争、接合、抗生素的产生、运动性、孢子及生物膜的形成等^[3]。目前, 细菌细胞间的信号传导在微生物学研究中已经成为一个新的领域, 对群体感应的研究也成为微生物学的一大热点。

根瘤菌与豆科植物共生关系的建立是两种生物间一个复杂的信号交流过程。侵染入植物细胞内的根瘤菌菌体逐渐膨大并形成多种特殊的形态, 这些具特殊形态的根瘤菌称为类菌体, 其生存在由膜包围的间隔区——共生小体内。每一个被感染的植物细胞内都充满着共生小体, 具有相当的细菌密度, 因此该情况下的共生过程可以通过 AHLs 介导的群体感应系统进行调控, 进而调节其生理活性。在根瘤菌的群体感应研究中, 对豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum* bv.

viciae) 的群体感应系统研究最为详细, 它共有 4 个群体感应系统 (*rai*, *rhi*, *cin* 和 *tra*), 产生 6 种 AHLs 分子, 其中 *rhi* 产生 3 种短链 AHLs, 该系统通过 RhiR 对 *rhi* ABC 进行调控从而影响结瘤效率^[4,5]。苜蓿根瘤菌 (*R. etli*) CNPAF512 有两个群体感应系统 *raiRI* 和 *cinRI*, 共产生 7 种 AHLs 分子, 其 *raiI* 突变株可以增加植株的结瘤数量, 该发现首次证明了群体感应与细菌的共生过程的密切联系^[6,7]。

本实验的研究目的是通过构建一株自体诱导物的高效检测菌株, 并以此对中慢生华癸根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 的自体诱导物进行初步研究。该根癌土壤杆菌检测菌株中所构建的超量表达根癌土壤杆菌 TraR 蛋白的质粒 (PT7-*traR*) 及含有 *PtraI-lacZ* 启动子序列的报告质粒, 由于 TraR 与自体诱导物结合后转变为活性形式并与 *tra* 的启动子序列结合, 启动其转录使 *lacZ* 表达。因此 TraR 的超量表达可提高其与自体诱导物的结合, 从而增强 *lacZ* 报告基因的表达, 提高检测菌株对自体诱导物的灵敏度。

利用本实验室所构建的高效检测菌株检测到华癸根瘤菌培养物上清中自体诱导物的存在, 为进一步研究其自体诱导物的合成酶基因及其表达调控具有重要意义, 同时有助于了解根瘤菌在豆科植物细胞内的生理行为, 为进一步了解根瘤菌与植物相互作用进行共生固氮这一复杂的生物过程提供理论依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (30200036), 国家杰出青年基金 (30325004), 霍英东基金 (91023)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-25-84396645, E-mail: jun-zhu@njau.edu.cn

作者简介: 高轶静 (1981-), 女 (壮族), 硕士研究生。E-mail: yijinggao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-05-17, 修回日期: 2004-11-15

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及生长条件 :表 1 为本试验的供试菌株和质粒及其特性。华癸根瘤菌在 TY 培养基

中 28℃ 培养 ,根癌土壤杆菌在 LB 培养基中 28℃ 培养。所用抗生素浓度为 :WCF47 所用四环素(Tc)为 1μg/mL ,JZA1 所用四环素(Tc)为 2μg /mL ;壮观霉素(Sp)为 100μg/mL ;庆大霉素(Gm)为 100μg/mL。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study		
Strains or plasmids	Characterization	Source or reference
<i>Mesorhizobium huakuii</i>		
Mh93	<i>Astragalus sinicus</i> L. as its host plant	Lab collection
Mh94	<i>Astragalus sinicus</i> L. as its host plant	Lab collection
CCBAU2609	<i>Astragalus sinicus</i> L. as its host plant	Dr. Chen Wenxin(CAU)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
WCF47	WCF47 (pCF218)(pCF372) , traI ⁻	8
JZA1	KYC55 (pJZ372)(pJZ384)(pJZ410) , Ti ⁻	This study
<i>Plasmids</i>		
pPZP201	Sp ^r ,broad host range vector	9
pSW213	Tc ^r pCF372 subcloning vector	10
pCF218	Tc ^r carrying P _{tet} -traR gene	11
pCF372	Sp ^r carrying traI-lacZ reporter fusion gene	12
pJZ372	Tc ^r carrying traI-lacZ reporter fusion gene	This study
pJZ384	Sp ^r pPZP201 carrying PT7-traR gene	This study
pJZ410	Gm ^r carrying T7 RNA polymerase gene	This study

1.1.2 试剂和仪器 : o-NITROPHENYL β-D-GALACTOPYRANOSIDE (ONPG),购于 Sigma 公司 ; C₁₈反相薄层层析板 ,购于 Merck 公司。

1.2 构建高效检测菌株 JZA1

将 PT7-*traR* 基因亚克隆至广宿主载体 pPZP201 中^[9] 构建得质粒 pJZ384 ;构建含有编码 T7 RNA 聚合酶基因的质粒 pJZ410 ;克隆 *traI-lacZ* 报告基因至质粒载体 pSW213^[10] ,构建得 pJZ372 质粒。该 3 种相容性质粒共转化至根癌农杆菌中 ,构建得自体诱导物检测菌株 JZA1。

1.3 自体诱导物活性检测(β-半乳糖苷酶法)

按照文献[11 ,13]进行操作。将检测菌株加入含有相应抗生素的 AT 培养基中并分装 ,分别加入华癸根瘤菌培养物的上清 ,培养至 OD₆₀₀ 为 0.2 ~ 1.0 加入 ONPG 显色。

1.4 Mh93、Mh94 和 CCBAU2609 的生长曲线及其自体诱导物活性曲线的制作

将待测菌株分别培养至 OD₆₀₀ 为 1 后转接 ,每 12h 取样 ,测 OD₆₀₀ ,pH 值并检测上清中 AI 的含量。

1.5 薄层层析

将待测菌株的培养物上清液用乙酸乙酯萃取后 ,点加在 C₁₈反相薄层层析板上 ,以乙酸乙酯为流动相进行层析 ,经风干后在薄板上铺一层含有 X-gal 和检测菌株(JZA1)的 AT 琼脂培养基 ,培养 12h 后观察薄板的颜色变化^[14]。

1.6 Mh93 上清调至不同 pH 值并振荡反应后进行

自体诱导物活性检测

培养 Mh93 至自体诱导物活性为最高时的细胞浓度 ,此时培养物 pH 为 7.84 ,取其培养物上清调至不同 pH 6.5 7.5 8.5 9.5 ,并振荡反应 ,取不同反应时间的上清进行活性检测。

2 结果和分析

2.1 检测菌株 JZA1 高效性的验证

JZA1 与 WCF47 均为敲除了自体诱导物合成酶基因 *traI* 的根癌农杆菌 ,由于自身不产生自体诱导物 ,其 *PtraI-lacZ* 的表达完全依赖于外源自体诱导物的诱导。JZA1 是在 WCF47 基础上 ,将其控制 *traR* 基因表达的 *Ptet* 启动子替换为 P_{T7} 强启动子 ,同时导入 T7 RNA 聚合酶 ,因此在培养过程中可超量表达 TraR。细胞中该蛋白的超强表达 ,对外源自体诱导物的敏感性增强 ,能高效检测外源自体诱导物。

通过利用合成的自体诱导物 *N*-3-oxo-octanoyl-L-homoserine lactone (3-oxo-C₈-HSL) (根癌农杆菌的自体诱导物) ,比较 JZA1 与 WCF47 在检测自体诱导物时的敏感性。结果显示(图 1) ,当自体诱导物浓度较低时(0.003nM) ,JZA1 能准确检测自体诱导物的存在 ,而 WCF47 则不能反映其存在 ;在自体诱导物浓度为 0.003 ~ 1.000nmol/L 时 ,JZA1 与 WCF47 均能检测到自体诱导物的存在 ,但 JZA1 对自体诱导物的检测更为灵敏 ;只有当自体诱导物浓度极高的时候

(> 10nmol/L), 两者检测的活性才比较接近。该实验充分说明了 JZA1 在检测自体诱导物时的高敏感性和高效性, 从而为紫云英根瘤菌中自体诱导物的研究提供了便利、可靠的手段。

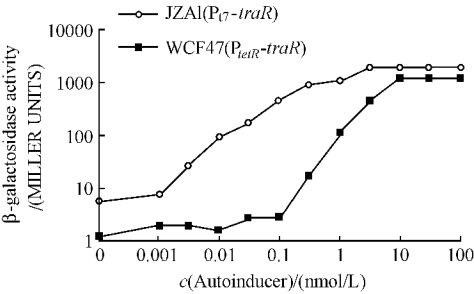


图 1 JZA1 与 WCF47 检测的 3-oxo-C₈-HSL 浓度-酶活曲线

Fig. 1 3-Oxo-octanoyl-HSL dose-response curves of *A. tumefaciens* strains JZA1(squares) and WCF47

Diamonds Synthetic 3-oxooctanoyl-HSL was diluted as indicated and added to 2mL of AT medium supplemented with approximately 10⁷ cells , incubated with aeration for 12h , and assayed for β-galactosidase activity.

2.2 JZA1 对 Mh93、Mh94 和 CCBAU2609 中自体诱导物的检测

2.2.1 Mh93、Mh94 和 CCBAU2609 的生长曲线、自体诱导物活性曲线及其 TLC 验证 :图 2 的生长曲线显示 3 株华癸根瘤菌在 TY 培养基中的生长具有明显的对数期和稳定期 ,同时自体诱导物活性曲线显示 随着细胞密度的不断增加 ,自体诱导物的含量也随之增加并存在最高值。其中 ,Mh93 的 AI 含量最高 ,Mh94 次之 ,而 CCBAU2609 最低。图 3 的 TLC 结果也显示 ,在 3 株华癸根瘤菌中均检测到一种具有相同迁移率的自体诱导物 ,可初步推断为同一种自体诱导物 ,但最终应依据结构分析的结果。斑点大小反映其自体诱导物的含量 ,与用 β - 半乳糖苷酶法的检测结果一致。以上结果说明了自体诱导物的表达情况在华癸根瘤菌种内水平上存在差异 ,该差异与紫云英根瘤菌的结瘤固氮能力是否相关需进一步研究。

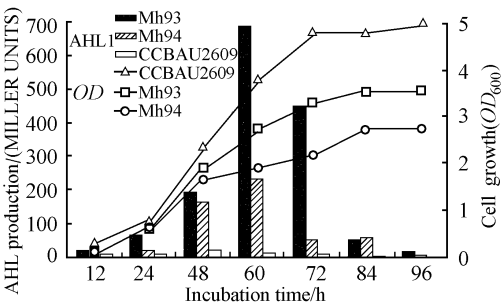


图 2 *M. huakuii* 的生长与自体诱导物活性变化

Fig. 2 Growth curve(linearity)and AHLs activity curve(pillar)of *M. huakuii*

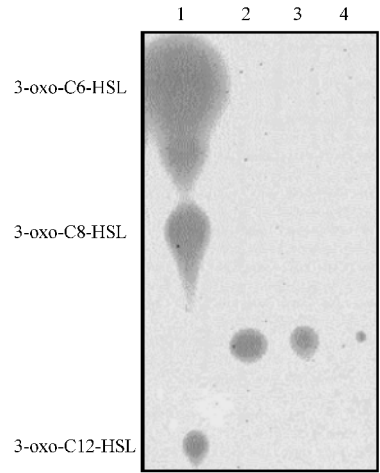


图 3 *M. huakuii* 的反相薄层层析

Fig. 3 TLC of autoinducers synthesized by *M. huakuii*

1. Synthetic AHLs ; 2. Mh93 ; 3. Mh94 ; 4. CCBAU2609.

2. 2. 2 pH 对 *M. huakuii* 中自体诱导物的影响 : AHLs 是由一个可变的乙酰基链尾部与一个稳定的高丝氨酸内酯头部相连 ,该结构在酸性条件下最稳定 ,强碱可能会导致高丝氨酸内酯开环 ,从而破坏其结构^[3,15]。图 2 的自体诱导物曲线显示 ,在菌体生长后期 ,AI 含量逐渐减少。经测定 ,Mh93 在生长初期(24h) AI 活性最高时(48h)及活性最低时(96h)培养物的 pH 值分别为 7.05、7.84 和 8.82 ,由此推测 Mh93 中 AI 的降解与 pH 值的升高有关。

为此 ,我们选择 Mh93 进一步研究 pH 值对 AHL 稳定性的影响。培养 Mh93 至自体诱导物活性最高时的细胞浓度 ,取其上清调至不同 pH 值进行反应 ,并取不同反应时间的上清进行活性检测。图 4 结果显示 ,pH 值越高 ,反应时间越长 ,AI 活性越低。这表明 ,在 Mh93 中体诱导物会随着环境 pH 值的升高而进行碱水解 ,从而导致其浓度降低 ,其半衰期与 pH 密切相关 ,显示了环境条件改变对群体感应的基因调控具有微调作用。此外 ,在 AI 的降解过程中也可能有酶在起作用 ,有待进一步研究。

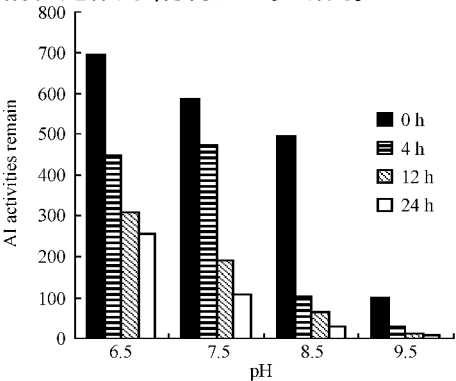


图 4 上清的 pH 值和反应时间对 AI 活性的影响

Fig. 4 Effect of AI activities on pH and time

3 讨 论

本实验成功地构建高效检测菌株 JZA1, 在 3 株华癭根瘤菌中均检测到自体诱导物的存在, 表明了华癭根瘤菌种内自体诱导物表达情况存在多样性, 并发现了培养基中 pH 值升高对自体诱导物稳定性的影响。

对群体感应的研究已有十几年时间, 对其信号分子结构和功能的认识也越来越深入, 而对与植物相互作用的根瘤菌的群体感应及其在菌植互作中的作用已成为该领域的研究热点。据报导, 豌豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌中的群体感应系统可能会影响结瘤数目和共生过程, 但其具体机制仍待研究^[4, 5]; 中华苜蓿根瘤菌的群体感应系统控制胞外多糖 EPS II 的产生, 该多糖与根瘤的形成过程有关^[16]。

利用本实验室所构建的高效检测菌株, 对华癭根瘤菌产生自体诱导物的种类及其差异性进行了比较, 同时对其自体诱导物的性质也进行了初步的研究, 这对于继续研究华癭根瘤菌中自体诱导物的合成酶基因及其表达调控, 并进一步研究群体感应的目的基因及其调节系统如何在华癭根瘤菌共生固氮过程中(如根毛吸附、结瘤和固氮能力等)发挥作用具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001 **55**: 165–199.
- [2] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol*, 1994 **176**: 269–275.
- [3] 钟增涛, 郑会明, 高轶静, 等. 细菌中的群体感应. *生命的化学*, 2003 **23**: 421–424.

- [4] Cubo M T, Economou A, Murphy G, et al. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCR* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *J Bacteriol*, 1992 **174**: 4026–4035.
- [5] Rodelas B, Lithgow J K, Wisniewski-Dye F, et al. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *J Bacteriol*, 1999 **181**: 3816–3823.
- [6] Daniels R, De Vos D E, Desair J, et al. The cin quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol*, 2002 **277**: 462–468.
- [7] Rosemeyer V, Michiels J, Verreth C, et al. luxI- and luxR-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol*, 1998 **180**: 815–821.
- [8] Zhu J, Beaber J W, More M I, et al. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1998 **180**: 5398–5405.
- [9] Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. The small, versatile pZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol*, 1994 **25**: 989–994.
- [10] Chen C Y, Winans S C. Controlled expression of the transcriptional activator gene *nirG* in *Agrobacterium tumefaciens* by using the *Escherichia coli* lac promoter. *J Bacteriol*, 1991 **173**: 1139–1144.
- [11] Fuqua W C, Winans S C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, 1994 **176**: 2796–2806.
- [12] Fuqua C, Winans S C. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol*, 1996 **178**: 435–440.
- [13] Miller J. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [14] Shaw P D, Ping G, Daly S L, et al. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997 **94**: 6036–6041.
- [15] Schaefer A L, Hanzelka B L, Parsek M R, et al. Detection, purification and structural elucidation of acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol*, 2000 **305**: 288–301.
- [16] Marketon M M, Glenn S A, Eberhard A, et al. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 1995 **185**: 325–331.

Study on AHL-like quorum signals in *Mesorhizobium huakuii*

GAO Yi-jing ZHONG Zeng-tao ZHENG Hui-ming WANG Hui ZHU Jun*

(Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Quorum sensing is a mechanism used by single-cell bacteria to monitor their population density and control a variety of physiological functions in a cell-density-dependent manner. An ultrasensitive quorum signal acyl-homoserine lactone (AHL) detecting *Agrobacterium tumefaciens* strain, which strongly overproduces quorum-sensing regulator TraR and was proved to be able to detect AHLs at nano-molar concentration, was used to detect the production of AHLs in three *Mesorhizobium huakuii* strains. We showed that AHLs were produced in these strains with some variations. We also found that elevating of medium pH during cell growth greatly affected the stability of AHL signals. This study paved the way of further studying the relationship between quorum sensing and symbiotic nitrogen fixation of the *M. huakuii* strains.

Key words: Quorum sensing, AHLs, *Mesorhizobium huakuii*