

苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)LuxR 家族 转录因子 ExpR 调节 *motC* 操纵子的表达

罗 利^{1,2}, 刘芳华^{1,2}, 朱家壁¹, 俞冠翹^{1*}

(¹ 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200032)

(² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 : 目前已知苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)Rm1021 ExpR⁺ 突变导致胞外多糖 II (EPS II) 的过量表达, 而胞外多糖是根瘤菌成功侵染宿主植物形成有效根瘤必需的物质。软琼脂板实验发现 ExpR⁺ 突变株运动能力有缺陷。但是鞭毛染色实验并没有检测到突变株的鞭毛与野生型有什么不同。通过启动子-*lacZ* 融合子进一步研究突变株中基因表达的差异发现, ExpR 以细胞密度依赖的方式调节 *motC* 操纵子的表达。由此可见, 在苜蓿中华根瘤菌中, ExpR 同时参与了胞外多糖 II 的合成和细胞运动能力的调节。

关键词 : *Sinorhizobium meliloti*, ExpR, β -galactosidase, Motility

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0474-04

苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)与宿主紫花苜蓿(*Medicago sativa*)通过复杂的相互作用, 发育形成有效根瘤, 将空气中的分子氮转化成可被植物利用的化合氮。而根瘤菌分泌的胞外多糖是根瘤发育时侵染线形成所必需的^[1,2]。苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)分泌两种胞外多糖, 胞外多糖 II (ESP II) 的合成分别受转录因子 ExpR 和 MucR 负调控, ExpR 和 PhoB 正调控^[3]。LuxR 家族转录因子 ExpR 以细胞密度依赖的方式激活胞外多糖 II 合成酶基因的表达, 而且可能参与细菌趋化性和运动相关基因表达调控^[4]。根瘤菌中与运动能力相关的 41 个基因, 包括 10 个 *che* 基因、4 个 *mot* 基因、15 个 *flg/flh/fli* 基因和 4 个 *fla* 基因, 成簇分布在 45kb 的根瘤菌染色体上; 其中, *flg/flh/fli/fla* 基因参与鞭毛的形成, 而 *che* 基因与趋化性相关^[5,6]。而苜蓿中华根瘤菌鞭毛的非定向运动由 *motA* 和 *motBCD* 控制^[7,8]。细胞质蛋白 MotC 与 MotE 相互作用, 稳定 MotB 的周质结构域, 从而使 MotA/MotB 形成稳定的胞膜质子通道^[9]。MotD 是细胞质蛋白, 与 Film 相互作用, 是细菌快速转动所必需的^[10]。我们发现, *expR*⁺ 突变体运动能力有缺陷, 其原因可能是在低细胞密度条件下该转录因子抑制了 *mot* 基因的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 细菌培养基和使用的抗生素 LB 培养基用来培养大肠杆菌(*Escherichia coli*), LB/MC 培养基用来培养根瘤菌^[11]。所有的固体培养基, 均由液体培养基中添加 1.5% 的琼脂粉

获得。所用抗生素及其用量如下: 氯霉素(chloramphenicol) 10 μ g/mL, 四环素(tetracycline) 10 μ g/mL, 庆大霉素(gentamicin) 50 μ g/mL, 新霉素(neomycin) 200 μ g/mL 和链霉素(streptomycin) 500 μ g/mL。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 来自 New England BioLab Inc; 少量胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒均来自博大泰克(BioDev)公司; T4 DNA 连接酶来自 TaKaRa 公司; X-Gal 和硝酸银等化学试剂均来自 Sigma 公司。

1.2 启动子 *lacZ* 翻译融合子的构建

以 *flaA*, *motC* 和 *cheY1* 所在的操纵子的 DNA 序列为参照, 设计含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点的启动子 PCR 引物。*motC* Left Primer: 5'-CCCAGCTTCTGTTCCAGGAATAAGGCAT-3' (*Bam*H I); *motC* Right Primer: 5'-CGGGATCCGCAATCTCTT TCTGATGCTCG-3' (*Hind* III); *flaA* Left Primer: 5'-CCCAA GCTTCGCAAGAATCCGTTAAGCA-3' (*Bam*H I); *flaA* Right Primer: 5'-CGGGA TCCTGGTCTTGAGTTGGGTGAT-3' (*Hind* III); *cheY1* Left Primer: 5'-CCCAAGCTTCGAAAGTTCTGCTCGTTGCG-3' (*Bam*H I); *cheY1* Right Primer: 5'-CGGGATCCCTT CCGTATCGGCAAGCAC-3' (*Hind* III)。在适当的退火温度下进行高保真 PCR 扩增, 用少量胶回收试剂盒回收产物片段, 37 $^{\circ}$ C 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 2h, 80 $^{\circ}$ C 高温失活 10min。用质粒抽提试剂盒抽提并纯化载体 pGD926, 用同样的方法酶切。取 6 μ L 回收的 PCR 产物和 2 μ L 的载体, 用 TaKaRa 的 T4DNA 连接酶, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化 DH5 α 感受态细胞。挑取转化子, 酶切鉴定。

基金项目: 国家“973 项目”(2001CB108901)

* 通讯作者。Tel: 86-21-54924160; Fax: 86-21-54924015; E-mail: gqyu@iris.sipp.ac.cn

作者简介: 罗 利(1978 -)男, 安徽人, 博士研究生, 研究方向为植物与微生物相互作用的分子遗传学。E-mail: lluo78@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-09-01; 接受日期: 2005-10-11; 修回日期: 2005-11-03

表 1 本试验所使用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relative characteristics	Reference or source
Strain		
<i>S. meliloti</i>		
Rm1021	Su47 str-21, ExpR ⁻ , wild type, Str ^r	[11]
Rm8530	formerly expR101, Rm1021 ExpR ⁺ , Str ^r	[2]
Rm11528	Rm8530 <i>sinR</i> : : Gen	[12]
<i>E. coli</i>		
DH5 α	sup E44 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR 17 rec A1 end A1 gyr A 96 thi-1 rel A1	Lab stock
MT1616	<i>pro-82 thi-1 endA1 supE44 hsdR17⁻ hsdM⁺ recA56</i> , Chl ^r , carrying pRK600	[13]
Plasmid		
pGD926	Tet ^r , no promoter- <i>lacZ</i> promoter fusion	[14]
pGQL21	Tet ^r , <i>fla</i> promoter- <i>lacZ</i> promoter fusion	This work
pGQL22	Tet ^r , <i>mot</i> promoter- <i>lacZ</i> promoter fusion	This work
GQL23	Tet ^r , <i>che</i> promoter- <i>lacZ</i> promoter fusion	This work

1.3 接合转移

应用三亲本接合转移法,将带有启动子-*lacZ* 翻译融合子的质粒转移至根瘤菌。以上述转化子作为供体菌,以 MT1616 和 Rm1021 分别为辅助菌和受体菌,培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ 重悬,以 1:1:1 比例混合,接种于无抗菌素平板上,培养过夜,挑取菌落涂布于抗性平板上,筛选接合转移子^[13]。

1.4 β -半乳糖苷酶活力测定

β -半乳糖苷酶活力按 Miller 方法测定^[15]。将接合转移子培养至对数前期 ($OD_{600} = 0.5$) 和对数后期 ($OD_{600} = 2.0$), 分别测定 β -半乳糖苷酶活力。

1.5 细胞运动能力测定

将根瘤菌培养至对数期,转接于 0.3% LB/MC 软琼脂平板上,培养 2~4d,测定扩散圈的直径^[16],并用 Kodak 数码相机拍照。

1.6 鞭毛染色(硝酸银法)

用 95% 的乙醇洗涤新的载玻片,在火上烘干。取一环菌,滴在载玻片的一端,倾斜载玻片使菌液流至另一端,晾干。用单宁酸溶液媒染 10min,用双蒸水轻轻冲洗。再用硝酸银溶液染色 5min,在酒精灯火焰上烘烤,直至有蒸汽冒出开始计时。然后用双蒸水洗去染料,在普通光学显微镜下观察拍照^[17]。

2 结果和讨论

2.1 ExpR⁺ 突变株的运动能力

将 3 种根瘤菌 Rm1021(野生型, ExpR⁻)、Rm8530(ExpR⁺) 和 Rm11528(ExpR⁺ 和 SinR⁻) 48h 培养物,室温静置 2h。发现 ExpR⁺ 突变细菌沉积于试管底部,而其它两株细菌都没有出现这种现象(图 1-A)。我们又将 3 种细菌的新鲜培

养物接种到 0.3% 的 LB/MC 软琼脂平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2d, 测得 Rm1021、Rm8530 和 Rm11528 3 种根瘤菌的扩散圈直径分别为 16mm、13mm 和 16mm; 培养至 4d, 扩散圈直径为 22mm、17mm 和 20mm。因此, ExpR⁺ 突变株的运动能力有明显缺陷(图 1-B)。为了确定这一现象是否与鞭毛的形成有关,进行了硝酸银染色试验,结果发现 3 株细菌的鞭毛数量并无明显区别。因此, ExpR⁺ 突变株的运动缺陷与鞭毛的多少无关。

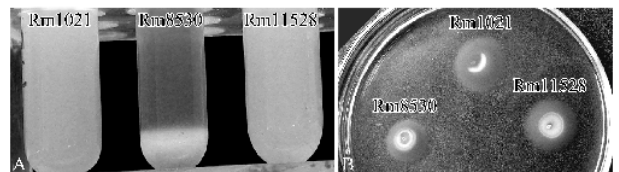
图 1 苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)的运动能力

Fig.1 Motility of *S. meliloti* strains. A: Cultures were stayed at room temperature for two hours; B: Migration of bacteria on a swarming plate.

This experiment was repeated three times.

2.2 ExpR 调节 *motC* 操纵子的表达

根据 Hoang 等^[4]的报道,苜蓿中华根瘤菌 SinR-Sin I 系统可能调节多个基因的表达,包括运动性、化学趋向性及其它细胞学过程中的基因,而且,这些调节作用可能依赖调节因子 ExpR 的存在。因此,我们分别构建了 *flaA*、*motC* 和 *cheY1* 启动子的 *lacZ* 融合子,来调查 ExpR 对这些操纵子表达的影响。

β -半乳糖苷酶活力的测定显示,在对数前期, *motC* 操纵子在 ExpR⁺ 突变株 Rm8530 中的表达量只相当于在野生型菌株 Rm1021 和 ExpR⁺ SinR⁻ 双突变型菌株 Rm11528 中的 1/2 左右,而在对数后期, *motC* 在 ExpR⁺ 突变株中的表达量与野生型菌株相当,略高于 ExpR⁺ SinR⁻ 双突变株中的表达量

(图2) ExpR 在低细胞密度下抑制 mot 操纵子的表达,而在高细胞密度条件下则解除抑制。 flaA 、 cheY1 启动子和 lacZ 融合子在3个菌株中的表达没有明显的差别。这些结果表明 ExpR 通过细胞密度依赖的方式调节 motC 操纵子的表达。

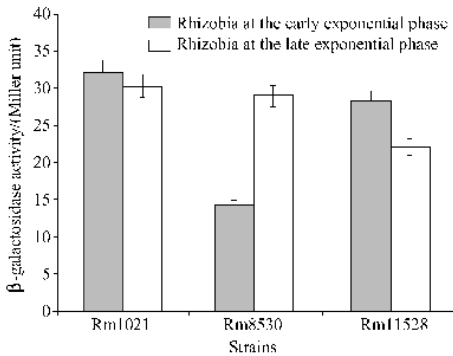


图2 motC 根瘤菌中的表达

Fig.2 The expression of motC .

通过实验观察到 expR^+ 突变株的运动能力有缺陷。但是这是什么原因造成的呢?首先,这一现象与鞭毛的形成没有关系,这也与鞭毛蛋白的表达相吻合。其次,我们知道 ExpR 是一个 LuxR 家族转录因子,而且以细胞密度依赖的方式调节胞外多糖 II 的合成^[18]。 β -半乳糖苷酶活力显示 motC 操纵子在 ExpR^+ 背景下也是以细胞密度依赖的方式表达(图2)。而 mot 相关的基因产物,组成细菌细胞膜上的质子通道,为鞭毛运动提供动力。因此, Rm8530 在低细胞密度条件下,下调 Mot 基因的表达,导致鞭毛动力不足,所以运动缓慢。这与我们观察到的根瘤菌在低细胞密度的运动相一致(图1-B)。综上所述, ExpR 在低细胞密度下抑制 motC 操纵子的表达可能是该基因获得功能突变株(Rm8530)运动缺陷的主要原因。

致谢 感谢 Anke Becker 博士、Graham C Walker 博士和 Juan E González 博士分别提供苜蓿中华根瘤菌菌株 Rm8530 和 Rm11528。

参 考 文 献

[1] Cheng HP, Walker GC. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 5183 - 5191.

[2] Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 4310 - 4318.

[3] Spaink HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**: 257 - 288.

[4] Hoang HH, Becker A, Gonzalez JE. The LuxR homolog ExpR , in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 5460 - 5472.

[5] Greck M, Platzer J, Sourjik V, *et al.* Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Mol Microbiol*, 1995, **15**: 989 - 1000.

[6] Scharf B, Schuster-Wolf-Bühning H, Rachel R, *et al.* Mutational analysis of *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 5334 - 5342.

[7] Scharf B. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 5979 - 5986.

[8] Platzer J, Sterr W, Hausmann M, *et al.* Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 6391 - 6399.

[9] Eggenhofer E, Haslbeck M, Scharf B. MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol*, 2004, **52**: 701 - 712.

[10] Schmitt R. *Sinorhizobial* chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology*, 2002, **148**: 627 - 631.

[11] Leigh JA, Signer ER, Walker GC. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 6231 - 6235.

[12] Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, *et al.* Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 325 - 331.

[13] Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, *et al.* Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol*, 1986, **167**: 66 - 72.

[14] Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, *et al.* Plasmids related to the broad host range vector, pRK290: useful for gene cloning and for monitoring gene expressing. *Plasmid*, 1985, **13**: 129 - 153.

[15] Miller J. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, 352 - 355.

[16] Wei X, Bauer WD. Tn5-induced and spontaneous switching of *Sinorhizobium meliloti* to faster-swarming behavior. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1228 - 1135.

[17] Mayfield CI, Inness WE. A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can J Microbiol*, 1977, **23**: 1311 - 1313.

[18] Pellock BJ, Teplitski M, Boinay RP, *et al.* A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 5067 - 5076.

A LuxR family regulator , ExpR regulates the expression of *motC* operon from *Sinorhizobium meliloti*

LUO Li ,LIU Fang-hua ,ZHU Jia-bi ,YU Guan-qiao*

(¹ Institute of Plant Physiology & Ecology , Shanghai Institute for Biological Sciences , Shanghai 200032 , China)

(² Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 ,China)

Abstract : In *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021 , ExpR⁺ mutation results in the overproduction of EPS II , which is required for efficient invasion of root nodules on the host plant alfalfa. When rhizobia were grown in LB/MC medium for 36-hour then placed at room temperature , most of ExpR⁺ mutant (Rm8530) cells aggregated at the bottom of the tubes , but ExpR⁺ sinR double mutant Rm11528 and wild type Rm1021 did not. The ExpR⁺ mutant was also found to swim slower than Rm1021 on swarming plates , but the ExpR⁺ sinR⁻ mutant showed almost the same as wild type. The average diameter of swarming plaques for Rm8530 , Rm11528 and Rm1021 was 13 , 16 and 16mm respectively , when bacteria were incubated at 28°C for two days. After four days , the plaques enlarged to 17 , 22 and 20mm , respectively. These results indicate that ExpR⁺ mutation causes a serious defection of motility in this condition. By flagella staining with silver nitrate method , it was noted that all three strains had flagella. It suggests that the swimming behavior of Rm8530 may not result from the change in components and structures of flagella. Based on DNA microarray data , Hoang speculated that the Sin system seemed to regulate a multitude of genes in *S. meliloti* , including genes that participate in succinoglycan production , motility , and chemotaxis , as well as other cellular processes (Hoang et al. 2004). And most of the regulation by the Sin system was dependent on the presence of the ExpR regulator. Accordingly , the expression of the *flaA* , *cheY1* and *motC* operon was determined using promoter : :lacZ fusion in different genetic backgrounds. The results showed two fold lower of *motC* expression activity in ExpR⁺ mutant strain Rm8530 than in wild-type strain Rm1021 at early exponential phase and this decrease was hold back by further mutation of sinR. However , the β -galactosidase activity of *motC*-lacZ fusion was almost the same in three strains at later exponential phase. These results suggest that ExpR may repress the expression of *motC* operon in a low cell density , but this repression can be deprived in a higher cell density. It may be a good explanation to the motility of Rm8530 on swarming plates , since it is lower cell density of bacteria on the swarming plates. Therefore , it may be concluded that ExpR both involved in the regulation of EPS II production and motility in *S. meliloti*.

Keywords : *Sinorhizobium meliloti* ; ExpR ; β -galactosidase ; Motility