

百脉根根瘤菌群体感应相关基因的克隆与表达

杨梦华, 钟增涛, 朱 军*

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

摘 要: 在实验室的纯培养条件下, 检测不到百脉根根瘤菌自体诱导物的产生, 但是通过基因序列同源性比对分析发现, 百脉根根瘤菌基因组中至少含有 4 种自体诱导物合成酶基因; 将其中一个自体诱导物合成酶基因 *ml4543* 克隆到大肠杆菌表达载体 pET30a, 构建得到能异源表达该基因的大肠杆菌重组菌株; 对该大肠杆菌重组菌株进行自体诱导物检测发现, 该合成酶基因在大肠杆菌中能合成至少 3 种自体诱导物因子。

关键词: 群体感应; 自体诱导物合成酶; 百脉根根瘤菌; 大肠杆菌重组表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-1007-04

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, 越来越多的研究表明群体感应参与调控根瘤菌许多与共生固氮作用相关的细胞行为, 如胞外多糖的产生, 侵染的过程, 生物膜 (biofilm) 的形成等^[1]。在豌豆根瘤菌中, 发现有 4 种群体感应体系 (rai, rhi, cin and tra)。这 4 种群体感应体系相互作用, 协同调节根瘤菌的结瘤、固氮等生理功能^[2]。但至今对于中慢生型根瘤菌的群体感应体系的研究并不多, 对华癸根瘤菌和天山根瘤菌的研究得知, 群体感应体系与根瘤菌的生物膜形成^[3], 结瘤效率, 胞外多糖的产生等都有着重要作用。

国内外对百脉根根瘤菌的群体感应体系都研究的不多, 但百脉根根瘤菌能与植物百脉根形成共生固氮关系, 而百脉根又是研究微生物与高等植物之间相互作用的一种理想模式植物^[4], 因此对百脉根根瘤菌群体感应的研究对于深入了解微生物与植物的相互作用关系具有很大的意义^[4]。利用本实验室所构建的一种检测自体诱导物的超敏感菌株^[5]对 8 种中慢生型根瘤菌的培养物上清进行自体诱导物检测^[6], 结果表明这几种根瘤菌在实验室培养条件下, 能产生结构和

数量不同的自体诱导物, 但却检测不到百脉根根瘤菌和鹰嘴豆中慢生根瘤菌的自体诱导物^[6]。然而, 通过基因同源比对发现, 百脉根根瘤菌基因组中至少含有 4 个与自体诱导物合成酶同源的蛋白基因。为进一步确定这些基因的功能, 同时对百脉根根瘤菌群体感应调控机制进行探讨, 把其中一种合成酶基因 *ml4543* 克隆到大肠杆菌表达载体进行异源表达, 分析大肠杆菌重组菌株培养液上清, 可检测到 3 种自体诱导物。这些结果说明, 百脉根根瘤菌中至少具有 4 种自体诱导物合成酶基因, 而其中一个基因在大肠杆菌中异源表达后仍能发挥其功能, 合成自体诱导物。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及生长条件: 表 1 为本试验所使用的菌株和质粒及其特性。百脉根根瘤菌在 TY 培养基中 28℃ 培养, 根癌土壤杆菌在 LB 培养基中 28℃ 培养, 大肠杆菌在 LB 培养基中 37℃ 培养。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strain and Plasmid	Characterization	Source or reference
Strains		
<i>Mesorhizobium loti</i>	Wild strain	CCBAU, Beijing, China
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (JZA1)	Detected strain	[7]
<i>Escherichia coli</i> (BL21/DE3)	Expression host	Promega Co.
Plasmids		
pET30a	Expression vector	Promega Co.
pJZ1004	Expression plasmid	This study

1.1.2 试剂和仪器: 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* 酶和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; ONPG

(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷) 和 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside, 异丙基- β -硫代半乳糖

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: 杨梦华 (1978 -), 女, 广东人, 博士研究生, 从事根瘤菌群体感应研究。E-mail: yangmenghua-2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-12-08, 接受日期: 2006-02-22, 修回日期: 2006-04-27

昔)购于 Sigma 公司;C18 反相薄层层析板购于 Merck 公司。引物合成及序列测定均由北京三博远志生物公司完成。

1.2 自体诱导物酰基高丝氨酸内脂类化合物的活性检测及薄层层析

具体操作按照文献 [7] 进行。

1.3 自体诱导物合成酶基因 *ml4543* 的克隆

根据基因 *ml4543* 的序列设计合成了以下一对引物: 5'-GGAATTCATATGCTTTTTTGTCTTACAACCTC-3'; 5'-CCGCTCGAGTTATGACGCCCTCCTTTGGCC-3'。并在引物两端分别设计有 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线部分),以百脉根根瘤菌基因组 DNA 作为模板,PCR 条件:94℃ 5min,94℃ 30s,56℃ 1min,72℃ 1.5min,循环 25 次,72℃ 10min,扩增得到 658bp 的基因片段 *mrl4543*。

1.4 重组蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 检测

将表达质粒转化大肠杆菌菌株 BL21/DE3,于含 50μg/mL Km 的 LB 培养基中,在 37℃ 摇床培养至 OD_{600} 达 0.2 后,加入 1mol/L IPTG 至终浓度为 0.5μmol/L,并继续培养 2h。分别收集细胞和培养液上清,向 1mL 所收集到的细胞加入 1 倍的 SDS-PAGE 上样缓冲液,稍振荡后于沸水中水浴 5min,即可进行全细胞蛋白 SDS-PAGE 分析;培养液上清经乙酸乙酯萃取后,进行活性检测及薄层层析分析。

1.5 百脉根根部分泌物的提取

百脉根种子分别经过 75% 乙醇和 0.1% 升汞表面灭菌后,用无菌水浸泡 2~3h,于含有湿润滤纸的培养皿中,在 28℃ 恒温培养箱催芽 2d 后,置于琼脂斜面上,并保持斜面底部具有适量无菌水,于 28℃ 恒温培养箱连续培养 3~4d 后,把斜面底部溶液吸出,并进行过滤除菌,所得溶液为百脉根根部分泌物的提取液。

将百脉根根部分泌物提取液与 2×TY 培养基等体积混合,并接种百脉根根瘤菌,以无菌水与 2×TY 培养基等体积混合作为负对照。在 28℃ 摇床中培养至 $OD_{600} = 2$,离心收集上清,并对上清进行自体诱导物活性检测。

2 结果和分析

2.1 百脉根根部分泌物对百脉根根瘤菌自体诱导物产生的影响

为检测植物根部分泌物是否能诱导百脉根根瘤菌产生自体诱导物,向培养基中加入百脉根的根部分泌物,百脉根根瘤菌在 28℃ 下摇床培养 2d 后,检测培养液上清的自体诱导物活性发现,不管根部分泌物是否添加,仍然未检测到百脉根根瘤菌自体诱导物的活性(图 1)。

2.2 百脉根根瘤菌自体诱导物合成酶的同源性分析

尽管在实验室纯培养条件下以及在加入百脉根根部分泌物的条件下培养,均检测不到百脉根根瘤菌培养液上清中自体诱导物的存在,然而,百脉根根瘤菌基因组全序列已经公开[http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=ntml02],与自体诱导物合成酶基因 *luxI*, *traI* 以及 *laxI* 等蛋白质序列(在 GenBank 中的序列号分别为 YP-

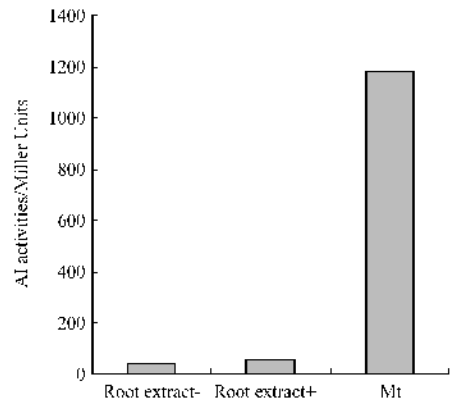


图 1 百脉根根部分泌物对百脉根根瘤菌合成自体诱导物 AHL 的影响

Fig.1 The effect of root extract of *Lotus japonicus* on acyl-homoserine lactone (AHL) production in *M. loti*. Root extract+ represents that the cell free supernatant assayed is from the cultural media that 50% root extract was added, while to root extract-, root extract was not added, and using the supernatant of *Mesorhizobium tianshanense* as positive control. Mt: *Mesorhizobium tianshanense*.

206882, NP-059761 和 AE004572) 进行同源比对发现,百脉根根瘤菌基因组中至少含有 4 种自体诱导物合成酶基因。其中,有两个基因(在 CMR 中的序列号为:NT02ML5016 和 NT02ML5286)与这 3 种蛋白的氨基酸同源性可达 30% 或更高,而另外两个基因(在 CMR 中的序列号为:NT02MLB0063 和 NT02ML4543)的同源性在 25% 左右。

2.3 大肠杆菌表达质粒 pJZ1004 的构建

通过 PCR 扩增得到约 600bp 的基因片段 *ml4543* 与大肠杆菌表达载体 pET30a 分别经 *Nde* I / *Xho* I 双酶切后,连接得到表达质粒 pJZ1004。由于该表达质粒具有利用乳糖的强诱导型启动子,在乳糖类似物 IPTG 的诱导下,可大量表达外源蛋白。把 pJZ1004 转化大肠杆菌菌株 BL21,得到异源表达 *ml4543* 基因的重组大肠杆菌菌株。

2.4 百脉根根瘤菌自体诱导物合成酶基因 *ml4543* 在大肠杆菌中的表达

根据合成酶基因 *ml4543* 的氨基酸序列,推测其分子量约为 20kDa。大肠杆菌重组菌株的表达质粒 pJZ1004 具有乳糖启动子,可在乳糖结构类似物 IPTG 的诱导下高效表达外源基因。图 2 为大肠杆菌重组菌株经 IPTG 诱导培养后,全细胞蛋白的 SDS-PAGE 分析。从图中可见,经 IPTG 诱导的重组菌株的全细胞蛋白电泳在标准分子量 20kDa 处有一条明显的蛋白条带(箭头所指),而不经 IPTG 诱导的重组菌株却没有,这表明 *ml4543* 在大肠杆菌中被成功表达。

2.5 大肠杆菌重组菌株的 AHLs 活性检测及 TLC 分析

利用本实验室构建的酰基高丝氨酸内酯(AHL)超敏感菌株 JZA1⁵³ 对大肠杆菌重组菌株培养液上清进行 AHL 活性检测,检测结果(图 3-A)表明经 IPTG 诱导后,大肠杆菌重组菌株培养液上清中自体诱导物活性明显要高于未经诱导的样品,这说明当百脉根根瘤菌自体诱导物合成酶基因

ml4543 在大肠杆菌中被超表达时,其蛋白功能也被加强,在大肠杆菌中也能合成自体诱导物 AHL。TLC 分析发现百脉根根瘤菌自体诱导物合成酶基因 *ml4543* 在大肠杆菌中能合成 3 种酰基高丝氨酸内酯类自体诱导物(图 3-B)。

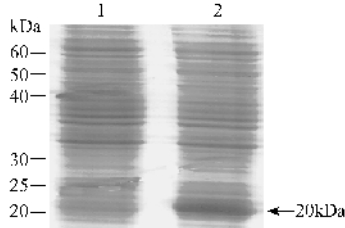


图 2 大肠杆菌重组菌株全细胞蛋白分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of whole cellular protein of *E. coli* recombinant strain. lane 1 showed the expressed protein in *E. coli* without induction; lane 2 showed the expressed protein in *E. coli* induced by IPTG. The recombinant protein of ML4543 was indicated by the arrow.

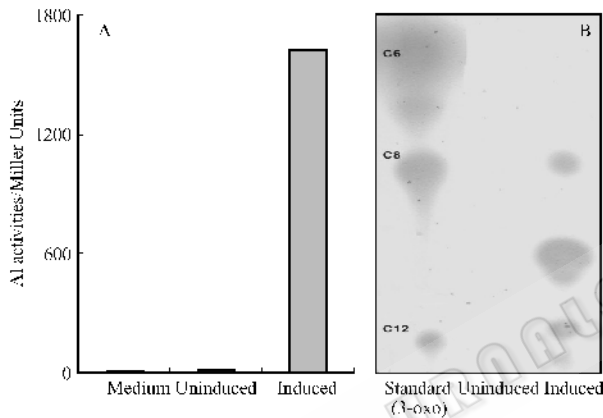


图 3 大肠杆菌重组菌株自体诱导物活性(A)及 TLC(B)分析

Fig. 3 Assay for AHL activity (A) and AHL content (B) of the cell-free supernatants of *E. coli* recombinant strain. Synthetic 3-O-C12-HSL, 3-O-C8-HSL, and 3-O-C6-HSL were used as standards in the TLC assay.

3 讨论

通过生物信息学基因同源比对的方法,发现百脉根根瘤菌基因组中具有至少 4 种自体诱导物合成酶基因,把其中一个合成酶基因克隆到大肠杆菌表达载体,并在大肠杆菌中诱导表达后,可检测到重组大肠杆菌菌株胞外有 3 种酰基高丝氨酸内酯类(AHL)自体诱导物因子。这说明,通过基因同源比对的方法所找到的基因确实具有自体诱导物合成酶的功能,同时也证明了百脉根根瘤菌中存在群体感应体系。

但是在实验室纯培养的条件下,却未能检测到百脉根根瘤菌胞外的自体诱导物,推测这很可能是受到植物对根际微生物的作用所影响。根瘤菌与植物之间形成的共生固氮关系是一个复杂的生理生化过程,其间需要植物与微生物之间不断的信号传导和信息的交换^[8,9]。因此,根瘤菌中群体感应体系往往比其他非共生型微生物的群体感应体系更为复杂,比如,同一个菌株存在有多个自体诱导物合成酶基因和

调控基因(LuxI-type and LuxR-type proteins),对不同的细胞功能进行调控,同时还受到植物根部分泌的信号因子及外部环境因素的调节^[10]。如 *Rhizobium* sp. NGR234 菌株的 pNGR234a 质粒上的 *traI/traB* 操纵子基因与根瘤根杆菌 Ti 质粒的 *tra* 系统具有极高的同源性,但其质粒转移效率却极大地低于 Ti 质粒,He 等^[11]推测这是由于 *Rhizobium* sp. NGR234 菌株的 *traR* 基因的表达受到植物某些代谢产物的调控。由此推测,百脉根根瘤菌的群体感应体系的功能主要是调控植物与微生物之间的相互作用,因此,尽管其基因组中含有 4 种与自体诱导物合成酶同源的基因,但其表达也许受到在自然环境中与植物形成共生固氮关系的过程中某些信号因子的严格调控,而这些调控因子也许并不是单纯的植物根分泌物,而是在植物与微生物相互作用的过程中所产生的。但在纯培养的条件下,根瘤菌缺乏与植物之间的相互作用,其体内的群体感应体系也就未能被启动。另外,自体诱导物的产生及其在细菌体外的累积除了与菌的浓度有关之外,也会受到多种因素的影响^[12]。在对华葵根瘤菌进行培养时发现在 TY 培养基中能检测到自体诱导物的合成,而在 MM 培养基中则不能检测到;慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的信号因子只有当生长环境中某些金属离子缺乏的条件下才被合成^[13,14]。而且自体诱导物 AHL 的稳定性在不同的 pH 值下会有很大差异^[7]。百脉根根瘤菌中确实含有群体感应体系,但有关该系统的功能及其调控仍有待更深入的探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] Gonzalez JE, Marketon MM. Quorum sensing in Nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67**(4): 574–592.
- [2] Lithgow JK, Wilkinson A, Hardman A. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol*, 2000, **37**: 81–97.
- [3] Wang H, Zhong ZT, Cai T, et al. Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*. *Arch Microbiol*, 2004, **182**: 520–525.
- [4] Toshiki U, Takuji O, Manabu I, et al. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 2439–2448.
- [5] Zhu J, Chai YR, Zhong ZT, et al. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 6949–6953.
- [6] 钟增涛,周晶,李路,等. 利用高效检测菌株对土壤中慢生根瘤菌及红壤中自体诱导物的检测. *土壤*, 2005, **37**: 62–64.
- [7] 高静,钟增涛,郑会明,等. 华葵根瘤菌中自体诱导物的初步研究. *微生物学报*, 2005, **45**(1): 20–22.
- [8] Bladergroen MR, Spaik HP. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, **1**: 353–359.
- [9] Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 5641–5652.

- [10] Brenic A , Winans SC. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* , 2005 , **69** (1) :155 – 194.
- [11] He XS , Chang W , Pierce DL , *et al.* Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer(*tra*) gene expression and influences growth rate. *J Bacteriol* , 2003 , **185** : 809 – 822.
- [12] Redfield RJ. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol* , 2002 , **10** : 365 – 370.
- [13] Loh J , Carlson RW , York WS , *et al.* Bradyoxetin , a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Nat Acad Sci* , 2002 , **99** : 14446 – 14451.
- [14] Loh J , Stacey G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum* : a unique integration of global regulatory circuits. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 10 – 17.

Recombinant expression of an autoinducer synthase of *Mesorhizobium loti* in *Escherichia coli* and analysis of the autoinducer produced in recombinant strain

YANG Meng-hua , ZHONG Zeng-tao , ZHU Jun *

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

Abstract : Although the autoinducers of *Mesorhizobium loti* could not be detected under the conditions of experimentally pure culture , and even adding some root extract of *Lotus japonicus* into the medium in which *M. loti* grew to detect the acyl-homoserine lactone (AHL) production , no positive result has been available. However , analysis of homologous comparison showed that there were at least four annotated acylated homoserine lactone (AHL) synthase genes from *M. loti* genome sequences. The amino acids of all these four genes showed different homologous to those of *lux I* , *tra I* and *lax I* all of which were AHL synthase genes and have been studied most before. By cloned into the expression vector of pET30a and transformed into *Escherichia coli* BL21 , one of these synthase genes , *ml4543* was overexpressed in *E. coli* , and a strong 20kDa protein band could be got by SDS-PAGE of the recombinant cells. It has been detected that at least three different AHLs were produced in the recombinant strain with IPTG induced. These results indicated that *M. loti* has the quorum sensing system and it may work under some specific growth conditions , most likely involved in the microbe-plant interaction. This study means to give some clues to any further study of the quorum sensing system of *M. loti*.

Keywords : Quorum sensing ; Autoinducer synthase ; *Mesorhizobium loti* ; Recombinant protein expression

Foundation item : National Science Foundation of China (30200036) ; National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30325004) ; Fund of Huo Yingdong (91023)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-25-84396645 ; E-mail : jun-zhu @ njau . edu . cn

Received 8 December 2005 / Accepted : 22 February 2006 / Revised : 27 April 2006