



华癸中慢生根瘤菌7653R 3个脂质转运蛋白基因的克隆、突变及共生表型

李亚楠, 曾小波, 周雪娟, 李友国*

华中农业大学, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 【目的】脂类转移家族蛋白基因编码一类参与脂类转运及代谢的蛋白。本研究旨在构建华癸中慢生根瘤菌3个脂质转运家族蛋白基因的突变株, 检测及分析突变体与紫云英共生条件下的表型及功能。【方法】利用生物信息学分析与预测转脂蛋白的结构特征及功能, 采用荧光定量技术检测目标基因在自生和共生条件下的表达特性, 通过插入突变技术构建目标基因突变株, 并进行植物盆栽实验考察其共生表型。【结果】*MCHK-5577*、*MCHK-2172*和*MCHK-2779*基因编码蛋白属于START/RHO alpha_C/PITP/Bet_{v1}/CoxG/CalC (SRPBCC)超家族, 包含脂类转移结构域, 参与脂类转运或代谢, 与百脉根等中慢生根瘤菌相应基因的序列相似性达95%以上。这3个基因在共生条件下的表达水平都增高。分别构建了*MCHK-5577*、*MCHK-2172*和*MCHK-2779*基因突变菌株, 与野生型菌株7653R相比, 接种突变株*MCHK-2172mut*、*MCHK-2779mut*和*MCHK-5577mut*后的植株地上部分生物量和根瘤固氮酶活性显著降低。【结论】华癸中慢生根瘤菌脂类转移家族蛋白基因在共生互作过程中发挥重要作用, 突变后明显影响共生固氮表型。本文的实验结果为深入研究脂类转移蛋白在共生固氮作用中的功能机制奠定了基础。

关键词: 转脂蛋白基因, 华癸中慢生根瘤菌, 插入突变, 共生表型

豆科植物能够与根瘤菌互作形成根瘤, 将空气中的氮气还原成铵, 以响应土壤中的低氮环境^[1]。该过程包括侵染线形成、根瘤菌从侵染线中以内吞方式释放进入植物细胞、分化形成类菌体, 其外包裹植物来源的一层膜结构。这层膜称为类菌体周膜, 也称为共生体膜。类菌体及其外包裹的共生体膜一起称为共生体(symbiosome)。

共生体是具有共生固氮能力的基本功能单位^[2]。共生固氮作用涉及共生双方基因的协调表达、信号传递、营养物质交流和能量传递。基于根瘤菌侵染线、共生体形成与发育的复杂性, 其过程是一系列有关基因时序表达的结果, 受到细菌和宿主植物的准确调控。在共生期间对细胞膜相关脂质的需求量增加, 根瘤菌需要大量脂质形成完整

基金项目: 国家自然科学基金(31371549)

*通信作者。Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-04-05; 修回日期: 2016-05-07; 网络出版日期: 2016-05-12

细胞膜来完成细胞分裂, 豆科植物则需要脂质来形成共生体膜, 进而形成完整的根瘤^[3-4]。因此, 在共生过程中, 脂类需求量增大, 但是这些脂质是如何转运的, 有关的根瘤菌基因应答及与宿主互作的途径目前尚未阐明。根瘤菌的脂类转移家族蛋白基因编码一类参与脂类转运、代谢的蛋白, 其功能表型以及与共生固氮作用的相关性, 研究报道相对较少, 愈来愈受到国内外生物固氮学者的关注。

脂类转移家族蛋白主要属于START/RHO alpha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC (SRPBCC)超家族蛋白, 该家族蛋白含有疏水配体结合区域, 能够结合各种各样的配体, 同时也包含类固醇调控相关蛋白的脂类转移结构域(START, steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer)和磷脂酰转移蛋白结构域(PITPs, phosphatidylinositol transfer proteins)及CoxG等结构域。PITP是真核生物的一种脂类转移蛋白, 能够结合和转移细胞膜间磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰胆碱(PC)^[5-7]。PCTP (Phosphatidylcholine transfer proteins)属于疏水性配体结合蛋白的START结构域超家族, 高度特异性的磷脂酰胆碱转移蛋白, 能够通过START结构域与PC的疏水性配体结合, 进而在膜间运输不溶性的脂类^[8]。

本实验室前期工作中研究了紫云英脂类转移蛋白基因*AsE246*在共生固氮过程中的功能机制^[9]。其它研究表明, 衣原体宿主菌的1种脂类转移蛋白CERT能够与衣原体的1种效应蛋白IncD发生互作, 共同将神经酰胺(ceramide)由内质网运送至包含体膜上。该文还发现CERT和IncD共定位于衣原体的包含体膜^[10]。还有研究阐明多种细菌感染宿主细胞主要依赖于脂筏的完整性, 通过脂筏侵入细胞时, 能避免其被宿主靶细胞内的溶酶体降解。脂筏在介导病原微生物感染宿主细胞过程中发挥重要作用, 被病原微生物利用为信号传递和入侵的平台, 从而逃避宿主免疫系统的防御反

应^[11]。根瘤菌与宿主植物细胞“内共生”关系的建立过程与病原菌-宿主细胞脂筏相互作用及“绑架”入侵具有高度相似性。但是关于根瘤菌的脂类转移家族蛋白基因对根瘤菌-豆科植物共生固氮作用是否有影响, 目前还未得到深入研究。

本文采用一种快速有效的方法进行目标基因的插入失活, 构建相应的突变体^[12-13]。对华癸中慢生根瘤菌7653R的3个脂类转运蛋白基因*MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*进行单交换突变, 获得3个突变株。通过基因结构特征分析及功能预测、基因表达和共生表型测定等, 初步探讨和分析它们在共生固氮作用中的功能和重要性, 从而提供对根瘤菌与豆科植物的相互作用机制的新认识和理解。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用供试菌株和质粒见表1。

1.1.2 酶、试剂和试剂盒: 限制性内切酶、T4-DNA连接酶、M-MuLV反转录酶、RNase inhibitor购自Fermentas公司和TaKaRa公司, PCR反应相关试剂、琼脂糖凝胶电泳Marker购自东盛公司, PCR产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海华舜(Watson)生物公司, 抗生

表1. 菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristic	Source
<i>M. huakuii</i> 7653R	Wild type, Str ^r	This lab
<i>E. coli</i> DH5a	Host of recombinant plasmids	This lab
<i>E. coli</i> S17-1	Host of transformation plasmids	This lab
pMD19-T(simple)	TA cloning vector, Amp ^r	TaKaRa Co.
pK19mob	Mutant strains construction vector, Kan ^r	This lab

素、培养基相关组分等分子生物学常规药品及试剂均购自中国国药集团。研究所用PCR引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, DNA的测序工作由天一辉远公司和南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.1.3 引物: 本实验所用引物见表2。

1.2 培养基和培养条件

7653R和相关突变株培养采用TY培养基, 筛选突变株时采用AMS培养基, 在28 °C培养。大肠杆菌的培养采用LB培养基, 在37 °C培养。

1.3 植物盆栽实验

参照文献[14]方法处理紫云英种子。催芽后的种子播种于含无氮植物营养液的无菌双层沙钵, 每组处理种5株。待植物幼苗长出第一片真叶后, 在根系接种1 mL相应根瘤菌悬液, 光照培养

箱培养30 d后观察共生固氮表型, 测定植株地上部分生物量鲜重、瘤重、瘤数和根瘤固氮酶活等指标。

1.4 目标基因在自生和共生条件下的半定量表达检测

分别抽提纯培养的华葵中慢生根瘤菌7653R和接种7653R的紫云英30 d根瘤的RNA, 纯化并测定浓度并进行反转录。以反转录后的cDNA为模板, 设定RT-PCR程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 1 min; 72 °C 10 min, 30个循环, 同时用*rnpB*基因作为内参。

1.5 荧光定量PCR

将反转录的cDNA调节至适宜浓度, 先用普通PCR将内参基因亮度调一致, 然后对目标基因进行扩增, 若条带单一, 大小正确, 才能再进行

表2. 供试PCR引物

Table 2. PCR primers used in this study

ID of primers	Sequences of primers (5'→3')	Characteristic
<i>MCHK-2779-F</i>	CCCAAGCTTGGGCGAGGTCTACAAGGAAGT	The forward primer of <i>MCHK-2779</i> exchange fragment
<i>MCHK-2779-R</i>	GCTCTAGACCAGGTCAGTTGGATATGGGTG	The reverse primer of <i>MCHK-2779</i> exchange fragment
<i>MCHK-2172-F</i>	CCCAAGCTTCCCATACGCCGCAACAG	The forward primer of <i>MCHK-2172</i> exchange fragment
<i>MCHK-2172-R</i>	GCTCTAGACGAACATCGTGCCCATCA	The reverse primer of <i>MCHK-2172</i> exchange fragment
<i>MCHK-5577-F</i>	CCCAAGCTTAGAGGCGATCTTCCCTCTG	The forward primer of <i>MCHK-5577</i> exchange fragment
<i>MCHK-5577-R</i>	GCTCTAGACATGAACAGGCCCATCAACT	The reverse primer of <i>MCHK-5577</i> exchange fragment
2779-P2	TGATCCACGGTGGCAAGA	The verification primer of <i>MCHK-2779</i> mutant
2172-P2	GTCACGCCGAAGAGTTCC	The verification primer of <i>MCHK-2172</i> mutant
5577-P2	AGACGGCTAATTTGATCCAAGAGAG	The verification primer of <i>MCHK-5577</i> mutant
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	The common forward primer of pK19 vector
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	The common reverse primer of pK19 vector
2779-F	GCGAGGTCTACAAGGAAGTGGT	The quantitative forward primer of <i>MCHK-2779</i>
2779-R	TCGAAGTCGCCAAAGGTTTT	The quantitative reverse primer of <i>MCHK-2779</i>
2172-F	GCCTATCCGCAATTCCTGC	The quantitative forward primer of <i>MCHK-2172</i>
2172-R	CGTTCTCGTCGGGCTTCA	The quantitative reverse primer of <i>MCHK-2172</i>
5577-F	GACATGGTCGCCCTACGAGA	The quantitative forward primer of <i>MCHK-5577</i>
5577-R	5'GCCTTGCCATTGCCTTCC	The quantitative reverse primer of <i>MCHK-5577</i>

荧光定量PCR检测。Real time qPCR程序：95 °C 5 min；94 °C 30 s；60 °C 20 s；72 °C 20 s；72 °C 5 min，循环40次。信号检测染料使用SYBR GREEN，分析相对表达量采用 $\Delta\Delta CT$ 值的方法，内参基因为*rnpB*。

1.6 目标基因的PCR扩增和DNA测序

根据华癸中慢生根瘤菌7653R基因组中的*MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*基因序列，从其ORF中选取一段作为交换片段，设计引物，引物的合成由天一辉远公司完成。PCR反应体系(20 μ L)：ddH₂O 13.9 μ L，10 \times E \times Taq Buffer 2 μ L，dNTPs 1 μ L，E \times Taq酶0.1 μ L，上游引物(10 μ mol) 1 μ L，下游引物(10 μ mol) 1 μ L，7653R总DNA 1 μ L。反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 1 min，30个循环；72 °C 10 min；25 °C保存。

将上述扩增产物与pMD19-T连接，送天一辉远公司测序。

1.7 目标基因的生物信息学分析

利用NCBI网站根据目标基因的ID名称来查找编码蛋白质的序列及名称，然后通过identify Conserved Domain 网页分析靶蛋白的保守结构域，根据保守结构域预测靶蛋白的功能；将蛋白序列通过BLAST比对查找同源蛋白，挑选不同物种的同源蛋白序列，通过DNAMAN软件来进行蛋白同源比对分析和保守区域疏水性氨基酸分析，使用Clustal X和MEGA 6软件的邻位相接法系统(bootstrap N-J Tree)来构建系统发育树。

1.8 分子生物学相关实验操作

7653R根瘤菌总DNA的抽提和质粒提取、酶切和酶连等试验方法均参照本实验室内部编写的《分子克隆实验指南》[△]进行。

1.9 单交换突变株的构建与筛选

以含有质粒pK19-目的基因片段的大肠杆菌S17-1为供体菌，野生型*M. huakuii* 7653R根瘤菌为受体菌进行两亲本杂交。将重组质粒pK19-目的基因导入7653R，基因通过同源交换重组将质粒整合到染色体上，使目标基因失活，质粒随染色体复制使菌体产生Neo抗性，用含Str+Neo的AMS选择性平板筛选突变体。

将筛选获得的单菌落转接至含Str+Neo抗性的TY平板上，以载体pK19mob的通用引物M13F与酶切位点对应的目的基因的筛选引物P2进行PCR扩增验证，同时用野生型7653R总DNA做模板作为对照，若野生型未扩出条带，筛选单菌落扩出与预期大小一致的条带，表明在所筛选获得的菌株中，重组质粒已整合至染色体上，即为单交换突变株。

2 结果和分析

2.1 *MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*基因的生物信息学分析

为了解和判断华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)7653R基因组中脂类转运家族蛋白在共生固氮中的功能和重要性，基于本实验室已完成的转录组数据，查找到3个脂质转运家族蛋白基因*MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*的表达信息(表3)。其中*MCHK-2779*和*MCHK-2172*在共生固氮过程中上调表达，而*MCHK-5577*呈下调表达。我们预测这3个基因可能在共生固氮过程中具有重要的功能。

根据这3个基因的蛋白保守结构域分析，发现三者都属于START/RHO_alp-ha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC(SRPBCC)配体结合结构域家

[△]《分子克隆实验指南》：农业微生物学国家重点实验室内部资料，未公开发表。

表3. *MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*的基因表达及编码蛋白Table 3. Characterization of gene expressions and proteins encoded by *MCHK-2779*, *MCHK-2172* and *MCHK-5577*

Gene ID	Location	Up or Down	Fold change	Gene length	Size in aa	Function
<i>MCHK-cl mhr2779</i>	Chromosome: 2725116-2725613	Up	15.9763	498	165	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport family protein
<i>MCHK-cl mhr2172</i>	Chromosome: 2125064--2125519	Up	3.3086	456	151	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport family protein
<i>MCHK-cl mhl5577</i>	Chromosome: 538063-5381158	Down	0.108	528	175	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport family protein

族。这类超家族包含脂类转移结构域, 编码脂类转移蛋白, 这些脂类转移结构域与真核或原核生物中的脂类转移作用有关。所以进一步推断这些基因可能与共生或自生过程中的脂质代谢相关。

将这3个基因的蛋白质序列分别与GenBank数据库的序列进行BLAST同源性比对和系统发育树分析, 系统发育树结果如图1。同源比对结果显示: *MCHK-2779*基因编码的蛋白和*M. loti* MAFF303099的*mhr1124*基因编码的未知功能蛋白(WP_019858598.1)相似性为98%; 与*Sinorhizobium fredii* HH103基因编码的未知功能的蛋白(CCF00274.1)相似性为37%; 除了根瘤菌之外, *MCHK-2779*编码的蛋白和*Streptomyces clavuligerus*的注释为polyketide cyclase蛋白相似性为34%。*MCHK-2172*基因编码的蛋白和*Mesorhizobium* sp. URHC0008的注释为ubiquinone-binding protein的相似性为100%; 与*Sinorhizobium meliloti* 注释为ubiquinone-binding protein的相似性为76%; 与非根瘤菌中的*Proteobacteria*菌株蛋白中注释为MULTISP-ECIES: ubiquinone-binding protein的相似性为84%。*MCHK-5577*基因编码的蛋白与*Mesorhizobium loti* NZP2037注释为polyketide cyclase蛋白相似性为99%; 与*Bradyrhizobium* sp. DFCI-1基因编码的膜蛋白相似性为57%; 与非根瘤菌中的*Variovorax paradoxus*注释为polyketide cyclase蛋白相似性为64%。从系统发育树可看出, 这3个基因与*M. loti*及*Mesorhizobium* sp. URHC0008的亲缘关系最接近, 3个基因分别属于3个不同的系统发育分

枝, 暗示它们可能具有不同的功能表型。综合看来, 这3个基因在中慢生根瘤菌属中是相当保守的。

2.2 *MCHK-2779*、*MCHK-5577*和*MCHK-2172*基因的表达特性

分别抽提纯培养的华葵中慢生根瘤菌7653R和接种7653R的紫云英30 d根瘤的RNA, 纯化测定浓度并进行反转录。以反转录后的cDNA为模板, 先PCR扩增并调整内参基因*rnpB*的基因条带亮度一致, 然后用荧光定量引物扩增*MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*基因。定性检测结果表明, 基因*MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*在纯培养和共生条件下都表达, 且共生条件下*MCHK-2779*和*MCHK-2172*基因表达量要高很多, *MCHK-5577*表达量与自生条件下相比, 差别不大。

设计*MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*荧光定量PCR引物, 分别用上述抽提并反转录的7653R和根瘤cDNA做模板, 定量检测这3个基因在自生和共生条件下的表达量变化(图2)。结果进一步表明这3个基因在共生状态下的表达量都升高, 与自生状态相比, *MCHK-2779*和*MCHK-2172*共生表达量升高了约100倍, *MCHK-5577*表达量升高了5倍左右。

总之, 定性和定量结果都表明, 这3个基因在共生固氮过程中可能具有重要功能。

2.3 *MCHK-2779*、*MCHK-2172*和*MCHK-5577*基因的突变体构建和鉴定

将重组质粒pK19-*MCHK-2779*/*MCHK-*

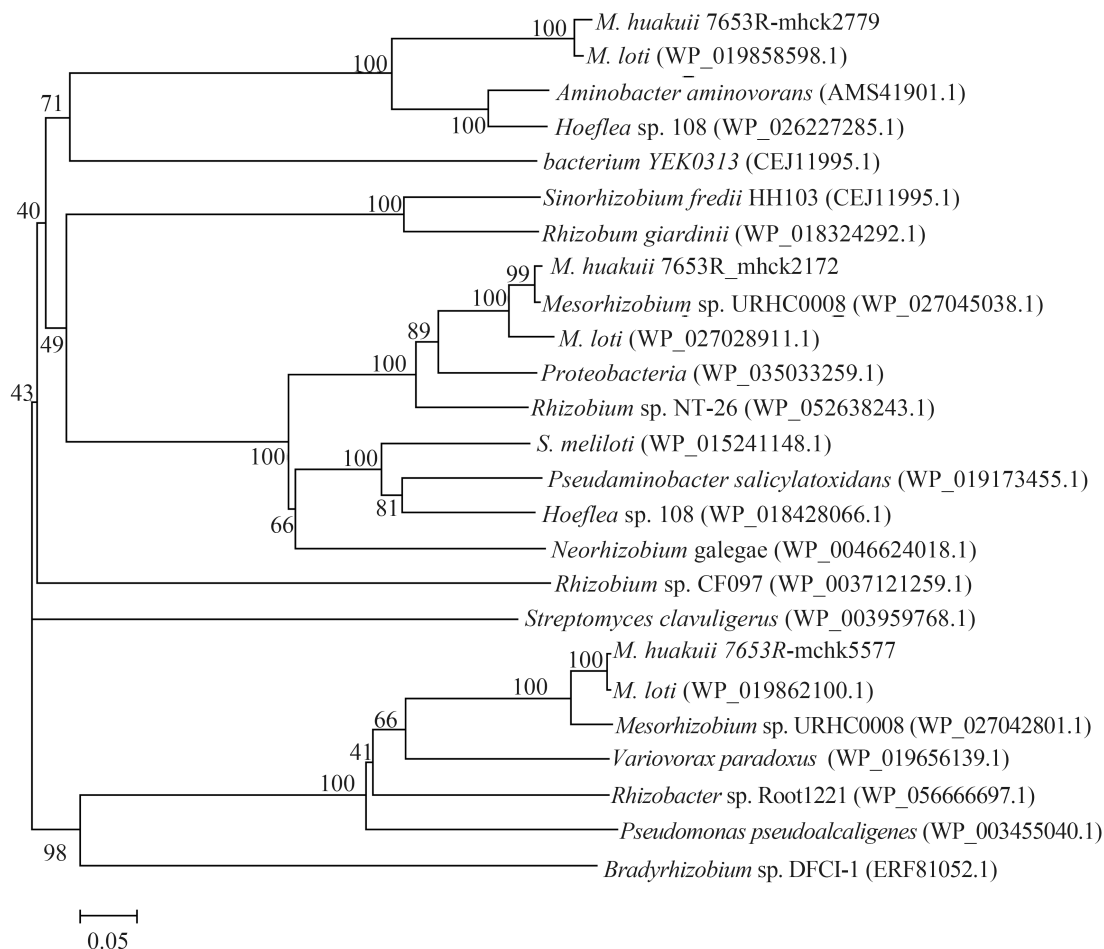


图 1. MCHK-2779、MCHK-5577和MCHK-2172系统发育树

Figure 1. The phylogenetic tree of MCHK-2779, MCHK-5577 and MCHK-2172 basing on amino acid sequence. The Phylogenetic analysis of MCHK-2779, MCHK-5577 and MCHK-2172 genes encoding proteins. The phylogenetic tree showing relationships between MCHK-2779/MCHK-5577/ MCHK-2172 protein and some highly homologous members from *Mesorhizobium loti*(WP_019858598.1, WP_019862100.1 and WP_027028911.1), *Sinorhizobium fredii* HH103(CCF00274.1), *Mesorhizobium* sp. URHC0008(WP_027042801.1 and WP_027045038.1), *Rhizobium giardinii*(WP_018324292.1), *Rhizobium* sp. CF097(WP_037121259.1), *Rhizobium* sp. NT-26(WP_052638243.1), *Aminobacter aminovorans*(AMS41901.1), *Bradyrhizobium* sp. DFCI-1(ERF81052.1), *Sinorhizobium meliloti*(WP_015241148.1), *Rhizobacter* sp. Root1221(WP_056666697.1), *Hoeflea* sp. 108(WP_026227285.1 and WP_018428066.1), *Variovorax paradoxus*(WP_019656139.1), *Neorhizobium galegae*(WP_046624018.1), *Streptomyce clavuligerus*(WP_003959768.10), *Pseudomonas pseudoalcaligenes*(WP_003455040.1), *Pseudaminobacter salicylatox-idans*(WP_019173455.1), *Proteobacteria*(WP_035033259.1) and *bacterium YEK0313*(CEJ11995.1). The neighbor-joining phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0 software. Bootstrap values (%) were calculated by 1000 resampling repetitions.

2172/MCHK-5577交换片段转化进入S17-1, 然后再通过两亲本杂交, 将各交换片段导入华癸中慢生根瘤菌7653R宿主菌中, 重组质粒上的各基因交换片段与根瘤菌基因组染色体中的MCHK-

2779、MCHK-2172和MCHK-5577基因发生同源重组, 整合到染色体上, 将这些基因失活, 由于pK19质粒本身不能在根瘤菌中游离存在, 只有整合到染色体上才能复制存活下来。质粒随染色体

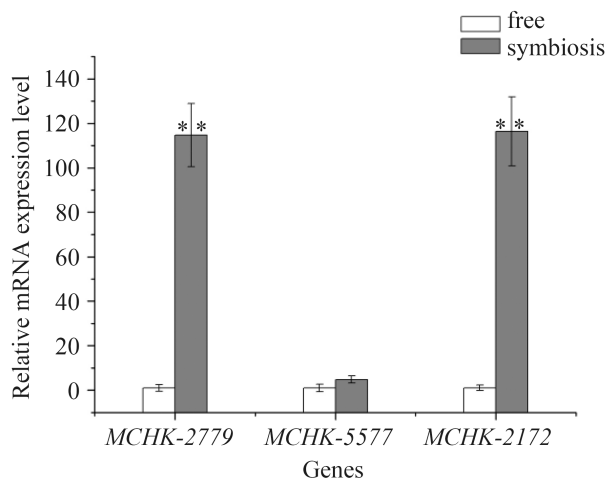


图 2. *MCHK-2779*、*MCHK-5577*和*MCHK-2172*自生和共生条件下的基因相对表达量

Figure 2. Genes relative transcription level of *MCHK-2779*, *MCHK-5577* and *MCHK-2172* under the free and symbiotic conditions. **: significant difference at $P < 0.01$; The error bars represent the standard deviations of three independent experiments.

复制使菌体产生Neo抗性, 用含Str+Neo的ASM选择性平板筛选突变体。

将筛选获得的单菌落转接至含Str+Neo抗性的AMS平板上, 进一步采用菌落PCR的方法, 以载体pK19mob的通用引物M13与酶切位点对应的目的基因的筛选引物P2进行PCR扩增验证, 同时用野生型7653R总DNA做模板作为对照。对扩增产物进行DNA凝胶电泳检测, 从电泳凝胶图可以看

出, 利用5577-P2和M13-R配对引物扩增的*MCHK-5577*突变株的产物约为600 bp, 用2172-P2和M13-F配对引物扩增的*MCHK-2172*突变株的PCR产物约为650 bp, 用2779-P2和M13-R扩出的*MCHK-2779*突变株的PCR产物约为750 bp(图3), 扩出的片段大小与预期一致, 且野生型7653R对照组均无条带扩出。这个结果说明, *MCHK-5577*、*MCHK-2172*和*MCHK-2779*单交换突变体已获得正确构建。

2.4 突变株的共生表型

以野生型*M. huakuii* 7653R、突变菌株*MCHK-5577mut*、*MCHK-2172mut*和*MCHK-2779mut*为接种菌株, 以不接菌作为空白对照, 接种紫云英进行盆栽试验, 观察表型及固氮酶活变化。在光照培养箱中培养30 d后收集植株, 观察和测定共生表型及结瘤情况。由图4和表4可见, 空白对照不结瘤, 植株呈黄色。与接种野生型菌株7653R相比, 接种*MCHK-2779mut*的植株地上部分矮小, 叶片发黄, 根瘤形状偏圆形, 且偏小, 颜色呈灰白色, 根瘤数量少, 鲜重减少, 根瘤固氮酶活显著降低; *MCHK-5577mut*突变株的共生表型缺陷更加明显, 植株矮小, 缺氮表型明显, 植株地上部分完全呈黄色, 根瘤呈偏白色, 根瘤固氮活性显著降低。*MCHK-5577mut*的共生表型特征与空

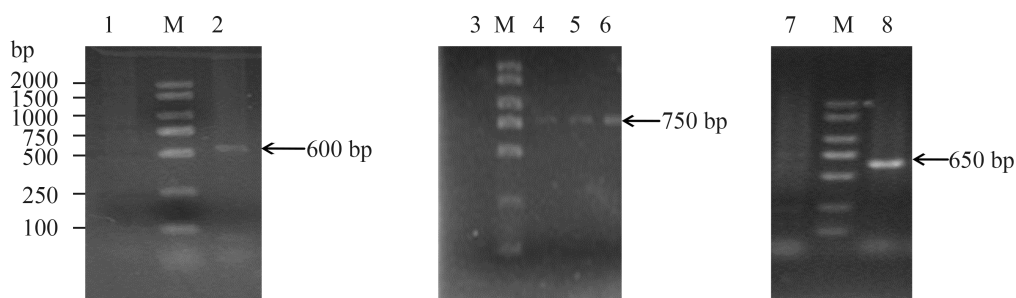


图 3. 突变株的菌落PCR验证

Figure 3. Identification of the mutants by colony PCR. M: DL2000 DNA marker; Lane 1, 3, 7: PCR products of wild-type 7653R genomic DNA; Lane 2: PCR product of *MCHK-5577* mutant genomic DNA; Lane 4–6: PCR products of *MCHK-2779* mutant genomic DNA; Lane 8: PCR product of *MCHK-2172* mutant genomic DNA.



图 4. *MCHK-2779*、*MCHK-5577*和*MCHK-2172*基因突变株与紫云英的共生表型

Figure 4. Symbiosis phenotypes of 7653R-2779mut, 7653R-5577mut and 7653R-2172mut tested on *Astragalus sinicus*. A: plants from left to right: 7653R-wild type, 7653R-2779mut, 7653R-5577mut, 7653R-2172mut and control; B: roots from left to right: 7653R-wild type, 7653R-2779mut, 7653R-5577mut, 7653R-2172mut and control.

表 4. *MCHK-2779mut*、*MCHK-5577mut*和*MCHK-2172mut*共生表型测定分析

Table 4. Symbiosis phenotypes analysis induced by 7653R-2779mut, 7653R-5577mut and 7653R-2172mut tested on *Astragalus sinicus*

Strains	Fresh weight of plant/ (mg/plant)	Number of nodule (/plant)	Fresh weight of nodule/ (mg/plant)	Nitrogen fixation activity/ ($\mu\text{mol/g nodule h}$)
CK	53.33 ^c ±0.70	0	0	0
<i>M. huakuii</i> 7653R	240.00 ^a ±54.00	20.3 ^{ab} ±6.94	14.85 ^a ± 0.02	15.30 ^a ±2.97
<i>MCHK-2779mut</i>	83.03 ^c ±5.00	8.92 ^c ±6.54	10.07 ^{ab} ±0.24	0.33 ^c ± 0.24
<i>MCHK-5577mut</i>	66.71 ^c ±7.08	23.00 ^a ±1.26	6.73 ^b ±2.10	0.20 ^c ±0.13
<i>MCHK-2172mut</i>	133.33 ^b ±25.77	17.17 ^b ±4.85	8.63 ^b ±2.23	9.38 ^b ±1.60

*: the date is average of three replicates. a, b, c values in each column followed by the same letter are not significance difference ($P < 0.05$).

白对照高度相似；*MCHK-2172mut*地上部分植株较野生型偏矮，地上部分鲜重、瘤重、根瘤固氮酶活均显著性降低，但是*MCHK-2172mut*根瘤呈粉色、仍具有一定的较低固氮酶活性。这些结果表明*MCHK-2779*、*MCHK-5577*和*MCHK-2172*基因对共生固氮作用都有显著的影响。但是从表型数据和植株长势来看，*MCHK-2779*和*MCHK-5577*可能在共生固氮中的功能作用更重要，因为这二者的突变体形成的根瘤几乎完全失去了固氮酶活性。

3 讨论

根瘤的发育及固氮是一个宿主豆科植物与根瘤菌双方多基因参与的过程，涉及信号传导、物质合成运输等过程^[1-3]，其中共生体中脂类的转运对于共生体发育具有重要的调控作用。脂类转运蛋白家族在真核生物中研究较多，Sugiki等^[16]通过SPR技术揭示了神经酰胺转移蛋白(CERT)中类固醇调控相关的脂类转移结构域(START)对于脂类转移过程的影响，Vordtriede等^[17]阐明人的PITP能够选择性的转运和促进脂类双分子层中PI和PC的

交换, 前期本实验室也研究了植物脂质转移蛋白 *AsE246* 基因在共生固氮过程中的相关功能^[9]。还有其它实验证据表明脂质转移蛋白除了能够参与脂类转移的过程, 还可以增强生物对于不利环境的适应性^[18]。

本文通过生物信息学分析 *MCHK-2779*、*MCHK-2172* 和 *MCHK-5577* 基因编码蛋白的保守结构域, 发现其含有非特异性的聚酮类化合物环化酶、脱氢酶和脂类运输结构域, 该结构域参与聚酮类化合物合成、脂类结合及运输^[17]。这些基因都含 START/RHO_alpha_C/PIT-P/Bet_v1/CoxG/CalC (SRPBCC) 配体结合结构域, 属于 SRPBCC 超家族, 涉及磷脂酰肌醇转移蛋白 (PITP) 和类固醇调控蛋白相关的脂类转移 (START) 结构域, 这些结构域与脂类运输相关^[5-8, 17], 所以我们推测 *MCHK-2779*、*MCHK-5577* 和 *MCHK-2172* 基因可能与共生体形成和发育过程中的脂类运输有关。

pK19mob 单交换诱变方法是研究根瘤菌基因功能的快捷方法之一^[12-14]。为了探究华癸根瘤菌的 3 个脂质转运家族蛋白基因 *MCHK-2779*、*MCHK-2171* 和 *MCHK-5577* 对根瘤发育及共生固氮的影响, 本文进行了一系列实验及检测。半定量及荧光定量数据分析结果显示, 这 3 个基因在共生固氮过程中表达量都明显升高, 其中 *MCHK-2779* 和 *MCHK-2172* 共生条件下表达量变化极其显著, *MCHK-5577* 基因表达量变化不显著, 该结果说明了其与共生固氮作用有关。构建了三者的单交换突变体, 并在缺氮条件下对其接种豆科植物的共生表型进行了观察。突变体盆栽实验结果显示: *MCHK-2779* 和 *MCHK-5577* 突变株植株地上部分矮小, 叶片发黄, 根瘤偏小, 呈偏白色。3 个突变体的植株鲜重和固氮酶活均显著降低。这些结果表明 *MCHK-2779*、*MCHK-2172* 和 *MCHK-5577* 与根瘤的发育及共生固氮都密切相关, 特别是 *MCHK-2779* 和 *MCHK-5577* 基因在共生固氮中的作用极其显著。不过我们也同时注意到, *MCHK-2172* 编码蛋白可能仅是共生过程中参与脂类转运

及代谢过程的一个辅助配体, 因而该基因的缺失突变所导致的共生固氮缺陷表型没有特别显著。相比较而言, *MCHK-2779* 和 *MCHK-5577* 对共生固氮表型影响极其显著。它们可能是与根瘤菌或宿主植物中的基因形成基因簇或互作来实现共生固氮相关的脂类转移过程, 该基因缺失导致这些过程受到阻碍, 进而显著影响根瘤共生体的发育和共生固氮。脂类转移蛋白基因与其它基因之间的互作来实现脂类运输的机制已有报道^[10, 15, 19]。例如, Derré I 等^[10] 研究表明沙眼衣原体效应蛋白 IncD 是宿主的 1 种神经酰胺转移蛋白 CERT 的专一性结合配体蛋白, *CERT* 基因敲除显著影响共生体中细菌的发育; 朱庆燕等^[19] 通过酵母双杂交实验筛选和鉴定了与宿主非特异性转脂蛋白基因 *AsE246* 互作的 DnaJ-like 蛋白 AsDJL1。另外, *MCHK-5577* 在自生和共生条件下表达量变化不是很显著, 但对共生固氮影响却极其显著, 原因可能是该基因是共生固氮及脂类转运过程中某个环节的关键调控基因, 该基因的存在与否对整个固氮及脂类转运过程影响很大, 但该过程与该基因的转录及翻译过程是独立的。Rivers 等^[20] 研究阐明了糖激酶 rhaK 的缺陷并不会影响 ABC 转运子相关成分的转录翻译或膜定位, 它的激酶功能和运输功能是独立的。*MCHK-5577* 的功能机制可能与此类似。

另外, 本研究中的 3 个脂质转移蛋白基因的共生表型存在一定差异, 其原因可能在保守结构域、同源蛋白比对和系统发育树等方面找到一些线索。例如, 通过保守结构域可看出, *MCHK-2779* 和 *MCHK-5577* 都含有特异性的 SRPBCC 结构域和非特异性的 polyketide.cyc2 结构域, 而 *MCHK-2172* 含有特异性的 COQ10p.like 结构域和非特异性的 polyketide.cyc2 结构域。特异性结构域的不同, 可能导致了它们转移脂类的种类、运输位置及方式的不同。同源蛋白比对和系统发育树分析发现, *MCHK-2779* 和 *MCHK-5577* 均与 *M. loti* 的相似性及亲缘关系最近, 而 *MCHK-2172* 与 *Mesorhizobium*

sp. URHC0008的相似性及亲缘关系最近。而且,它们三者的共生表达水平也是具有一定差异的。总之,以上这些暗示了三者的基因功能表型可能有所不同。

本文是首次对根瘤菌中脂类转移蛋白基因对共生固氮作用的影响的报道。我们通过实验分析,认为根瘤菌中的这些脂类转移蛋白可能在共生固氮中参与共生体形成和发育中所需的不同脂质的转运过程,但具体转运机制及转运脂质种类有待进一步的实验研究。例如,可以通过野生型根瘤和突变株根瘤中脂质含量的变化测定来观察其对脂质种类运输的影响,通过免疫电镜来观察根瘤中这些脂质转移相关蛋白的表达定位,还可以通过细菌双杂交或酵母双杂交筛选与其互作的相关基因等等。

参考文献

- [1] Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 1995, 7(7): 869–885.
- [2] Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Laccarino M. Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology*, 2004, 234: 201–262.
- [3] Moling S, Pietraszewska-Bogiel A, Postma M, Fedorova E, Hink MA, Limpens E, Gadella TW, Bisseling T. Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in *Medicago* nodules. *The Plant Cell*, 2014, 26(10): 4188–4199.
- [4] Geurts R, Fedorova E, Bisseling T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(4): 346–352.
- [5] Routt SM, Bankaitis VA. Biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 2004, 82(1): 254–262.
- [6] Allen-Baume V, Ségui B, Cockcroft S. Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. *FEBS Letters*, 2002, 531(1): 74–80.
- [7] Van Tiel CM, Schouten A, Snoek GT, Gros P, Wirtz KWA. The structure of phosphatidylinositol transfer protein α reveals sites for phospholipid binding and membrane association with major implications for its function. *FEBS Letters*, 2002, 531(1): 69–73.
- [8] Roderick SL, Chan WW, Agate DS, Olsen LR, Vetting MW, Rajashankar KR, Cohen DE. Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(7): 507–511.
- [9] Lei L, Chen L, Shi XF, Li YX, Wang JY, Chen DS, Xie FL, Li YG. A nodule-specific lipid transfer protein AsE246 participates in transport of plant-synthesized lipids to symbiosome membrane and is essential for nodule organogenesis in Chinese milk vetch. *Plant Physiology*, 2014, 164(2): 1045–1058.
- [10] Derré I, Swiss R, Agaisse H. The lipid transfer protein CERT interacts with the *Chlamydia* inclusion protein IncD and participates to ER-*Chlamydia* inclusion membrane contact sites. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(6): e1002092.
- [11] Vieira FS, Corrêa G, Einicker-Lamas M, Coutinho-Silva R. Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? *Biology of the Cell*, 2010, 102(7): 391–407.
- [12] Schfer A, Tauch A, Jger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1): 69–73.
- [13] Abd-El-Karem Y, Elbers T, Reichelt R, Steinbüchel A. Heterologous expression of *Anabaena* sp. PCC7120 cyanophycin metabolism genes *cphA1* and *cphB1* in *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* 1021. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1177–1192.
- [14] Wu M, Chou MX, Li YX, Chen DS, Li YG. Isolation and identification of an up-regulated nodulin gene *AsB6* involved in symbiotic nitrogen fixation of *Astragalus sinicus* L. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(2): 169–174. (in Chinese)
吴梅, 丑敏霞, 李一星, 陈大松, 李友国. 参与紫云英共生固氮的1个上调表达结瘤素基因 $AsB6$ 的分离与鉴定. *华中农业大学学报*, 2010, 29(2): 169–174.
- [15] Kim YJ, Guzman-Hernandez ML, Wisniewski E, Echeverria N, Balla T. Phosphatidylinositol and phosphatidic acid transport between the ER and plasma membrane during PLC activation requires the Nir2 protein. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(1): 197–201.
- [16] Sugiki T, Takahashi H, Nagasu M, Hanada K, Shimada I. Real-time assay method of lipid extraction activity. *Analytical Biochemistry*, 2010, 399(2): 162–167.
- [17] Vordtriede PB, Doan CN, Tremblay JM, Helmkamp GM Jr, Yoder MD. Structure of PITP β in complex with phosphatidylcholine: comparison of structure and lipid transfer

- to other PITP isoforms. *Biochemistry*, 2005, 44(45): 14760–14771.
- [18] Chen DS, Li YG, Zhou JC. The symbiosis phenotype and expression patterns of five nodule-specific genes of *Astragalus sinicus* under ammonium and salt stress conditions. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(8): 1421–1430.
- [19] Zhu QY, Li YX, Wang N, Chen DS, Li YG. Screening of target protein interacting with lipid transfer protein AsE246 of *Astragalus sinicus* and expression characteristics of corresponding encoding gene. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(10): 1320–1326. (in Chinese)
- 朱庆燕, 李一星, 王宁, 陈大松, 李友国. 与紫云英转脂蛋白 AsE246相互作用靶蛋白的筛选及其基因表达特征. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1320–1326.
- [20] Rivers DMR, Oresnik IJ. The sugar kinase that is necessary for the catabolism of rhamnose in *Rhizobium leguminosarum* directly interacts with the ABC transporter necessary for rhamnose transport. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(24): 3812–3821.

Cloning, mutagenesis and symbiotic phenotype of three lipid transfer protein encoding genes from *Mesorhizobium huakuii* 7653R

Yanan Li, Xiaobo Zeng, Xuejuan Zhou, Youguo Li*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] Lipid transfer protein superfamily is involved in lipid transport and metabolism. This study aimed to construct mutants of three lipid transfer protein encoding genes in *Mesorhizobium huakuii* 7653R, and to study the phenotypes and function of mutations during symbiosis with *Astragalus sinicus*. [Methods] We used bioinformatics to predict structure characteristics and biological functions of lipid transfer proteins, and conducted semi-quantitative and fluorescent quantitative real-time PCR to analyze the expression levels of target genes in free-living and symbiotic conditions. Using pK19mob insertion mutagenesis to construct mutants, we carried out pot plant experiments to observe symbiotic phenotypes. [Results] *MCHK-5577*, *MCHK-2172* and *MCHK-2779* genes encoding proteins belonged to START/RHO alpha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC (SRPBCC) superfamily, involved in lipid transport or metabolism, and were identical to *M. loti* at 95% level. Gene relative transcription level of the three genes all increased compared to free-living condition. We obtained three mutants. Compared with wild-type 7653R, above-ground biomass of plants and nodulenitrogenase activity induced by the three mutants significantly decreased. [Conclusion] Results indicated that lipid transfer protein encoding genes of *Mesorhizobium huakuii* 7653R may play important roles in symbiotic nitrogen fixation, and the mutations significantly affected the symbiotic phenotypes. The present work provided a basis to study further symbiotic function mechanism associated with lipid transfer proteins from rhizobia.

Keywords: lipid transfer proteins, *Mesorhizobium huakuii*, insertion mutagenesis, symbiotic phenotypes

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31371549)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

Received: 5 April 2016; Revised: 7 May 2016; Published online: 12 May 2016