

斯氏假单胞菌 A1501 固氮新基因 PST1305 的功能分析

樊慧俐, 燕永亮, 李燕, 平淑珍, 张维, 陈明, 林敏, 陆伟*

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 【目的】研究斯氏假单胞菌 A1501 基因组“固氮岛”中 PST1305 基因在 A1501 生物固氮过程中所起的作用。【方法】利用同源重组与三亲接合的方法构建 PST1305 的非极性突变株。乙炔还原法测定固氮酶活。RT-PCR 分析 PST1305 基因与其周围基因转录单元的关系, Real-Time PCR 比较 PST1305 在最佳固氮与非固氮条件下表达水平的差异。【结果】突变株 np1305 的固氮酶活显著降低, 功能互补菌株 np1305Comp 能基本恢复细胞的固氮作用。PST1305 与其上游的 *nifB*、*fdxN*、下游的 *nifQ* 等基因位于同一个转录单元, 组成一个操纵子。基因芯片表明, PST1305 基因在固氮比非固氮条件下表达量显著上调(约 38.7 倍), Real-Time PCR 验证支持这一结果。【结论】PST1305 基因参与固氮过程, 其突变会影响固氮酶的活性, 该基因可能通过参与 A1501 固氮酶电子传递或者固氮酶的氧保护过程影响固氮效率。

关键词: 斯氏假单胞菌 A1501; 生物固氮; Real-Time PCR; 固氮新基因

中图分类号: Q933 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)05-0580-05

斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501, 20 世纪 80 年代分离自我国南方水稻根际土壤^[1], 属于变形细菌 γ 亚群。该菌在微好氧条件下具有良好的固氮活性, 而且固氮产物能够迅速被水稻直接吸收利用^[2]。这是目前在假单胞菌属中发现的少有的具有联合固氮特性的菌株之一。

不同固氮菌的固氮酶系统在基因结构和组织水平上存在着很大的差异。模式菌 *Klebsiella pneumoniae* 只在厌氧条件下固氮, 其固氮基因排列紧凑, 仅 20 个基因参与固氮过程。*Azotobacter vinelandii* 在好氧条件下可以固氮, 该菌自生有一套氧保护机制, 确保固氮酶活性不被 O₂ 破坏, 但过量氧存在时固氮酶合成亦会受阻^[3-4], 在基因排列上, 该菌的固氮基因被分割在 3 个不同区域。斯氏假单胞菌 A1501 的基因组测序工作已经完成^[5], 在其基因组中, 一个长 49 kb, 由 59 个基因编码的“固氮岛”

被发现。A1501 菌可在微好氧的条件下固氮; “固氮岛”中包括了 A1501 所有固氮相关基因, 另外尚有 20 多个功能未知基因穿插于传统的固氮基因之间, 且与已知固氮基因组成同一操纵子结构。固氮基因组成的不同昭示着不同的固氮菌在长期的进化过程中为了适应不同生活环境而对基因进行了一定的取舍。

“基因岛”一般都是在细菌进化过程中, 通过基因水平转移的手段与其他物种进行遗传信息交流而获得的^[6]。“基因岛”可赋予宿主菌适应环境的选择优势。固氮岛中插入的未知功能基因在长期的进化过程中保留下来, 可能在 A1501 的固氮过程中发挥作用。本文通过构建整合突变株、测定生理生化指标, 并在芯片数据的基础上采用荧光适时定量 PCR 方法对 A1501 固氮岛内一个新的基因 PST1305 的功能进行了分析及验证, 该结果为进一步鉴定

基金项目: 国家自然科学基金(30800022); 国家重点基础研究发展计划(2007CB109203)

* 通信作者。Tel: +86-10-82106106; E-mail: luwei0317@vip.sina.com

作者简介: 樊慧俐(1983-), 女, 山西文水人, 硕士, 主要从事环境微生物基因资源方面的研究。E-mail: fanhuili02@yahoo.cn

收稿日期: 2008-12-08; 修回日期: 2009-02-01

PST1305 在 A1501 菌生物固氮过程中的具体作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501 为本实验室分离和鉴定的联合固氮菌感受态细胞 *E. coli* JM109 购自 TransGen Biotech 公司。pK18mob 为本实验室保存的自杀性载体,具有 Km 抗性,用于同源单交换^[7];pRK2013 为辅助质粒,帮助供体菌转入受体菌中^[8],具有 Km 抗性;广宿主质粒 pVK100 用于构建功能互补质粒,具有 RK2 复制子和 Km、Tc 双重抗性^[9]。

1.1.2 培养基与生长条件:LB 培养基用于大肠杆菌 37℃培养,Medium K 基本培养基^[10]用于斯氏假单胞菌 30℃培养。抗生素的使用浓度为卡那霉素 50 μg/mL,氨苄霉素 50 μg/mL,四环素 15 μg/mL。

1.1.3 主要试剂:限制性内切酶和 Ex-Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;PCR 纯化回收试剂盒和荧光染料试剂盒均购自 QIAGEN 公司;RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司;T4 连接酶、反转录试剂盒购自 New England Biolabs 公司。

1.2 PST1305 基因片段的克隆及重组载体 p05-1 的构建

根据斯氏假单胞菌 A1501(GenBank 登录号 CP000304)的 PST1305 基因序列,设计一对 PST1305 基因特异性引物 P1305F(5'-GTCCTGCATCATCTTC TACGAG-3')和 P1305R(5'-AGCTCGCCGTACTTGA TCG-3')。以野生型 A1501 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增并纯化。将纯化后的 PCR 产物和自杀载体 pK18mob 经 *Sma* I 酶切,连接后,转化 *E. coli* JM109 菌株,测序验证正向插入的阳性克隆,得到重组载体并命名为 p05-1。

1.3 斯氏假单胞菌 PST1305 非极性突变株的构建

利用三亲接合的方法将重组载体 p05-1 转入野生型 A1501,通过重组单交换得到 PST1305 基因非极性突变株 np1305(非极性突变:目的基因的突变不影响下游基因的转录),具体方法见参考文献[11]。在 PST1305 的下游 *nifQ* 内部设计一个 PCR 验证引物 P1305conR(5'-GTCGTTGACTGCGACCTCC-3'),利用 pK18mob 载体上的通用 P18conF(5'-GCCGATTCAITTAATGCAGCTGGCAC-3')和 P1305conR,验证含有重组载体是否整合到野生型 A1501 的染色体上。

1.4 功能互补菌株的构建

设计引物 P1305F2(5'-CCAAGCTTCGAATCCTG CGTCAA-3')和 P1305R2(5'-CCAAGCTTGATGATCTG CGCTAGCCA-3')划线部分为加入的 *Hind* III 酶切位点,扩增完整的 PST1305 基因,将此片段连接到经同样酶切的广宿主载体 pVK100,得到重组质粒 pVKP1305。用三亲接合的方法将该质粒转入 np1305,得到 PST1305 突变株的功能互补菌株,命名为 np1305Comp。

1.5 RT-PCR 转录单元的研究

在固氮条件下,分别提取野生型 A1501 和 np1305 的总 RNA,并反转录为 cDNA。设计 PST1302 ~ *nifQ* 基因的验证引物 P1306F(5'-CCTGGATCTACTGGAACAAC-3')和 P1302R(5'-CCGCTGTCTTCAATGCCTC-3')。另外,由于 PST1310 和 PST1311 基因转录方向相反,设计 P1310F(5'-GTTTCGATGAACCATCCCTCCG-3')和 P1311R(5'-CGGGATAGATAGACGGGAGCAC-3')验证提取的 RNA 中是否有 DNA 污染。

1.6 突变株及功能互补菌株的生长情况和固氮酶活的测定

野生型 A1501、np1305、np1305Comp 生长曲线及固氮酶活的测定见参考文献[12]。

1.7 固氮和非固氮条件下, PST1305 基因表达情况的比较

分别以固氮(0.1 mmol/L NH₄⁺和 0.5% O₂)和非固氮条件下(20 mmol/L NH₄⁺和 21% O₂)A1501 的 cDNA 为模板, P1305F3(5'-CCGAACAGGCACTGGAGC-3')和 P1305R3(5'-GCATTGATGCCGACCAG-3')为引物,Real Time PCR 比较这两种处理条件下 PST1305 基因表达量的差异。所选择的每个基因的扩增作三个重复,利用 16S rDNA 作为内标基因。

2 结果和分析

2.1 PST1305 基因保守结构域及同源进化分析

PST1305 基因包含一个砷酸盐还原酶(Arsenate reductase related protein)的保守结构域。将该基因编码的蛋白在 NCBI 上进行 Blast 比对并同源进化分析,结果表明:该蛋白与棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii* AvOP)、海洋固氮蓝藻(*Lyngbya* sp. PCC 8106)、硫酸盐还原菌(*Desulfuromonas acetoxidans* DSM684)中所编码的固氮相关蛋白(nitrogenase-associated protein)同源性较高,分别为 63%、58%、57%(图 1)。

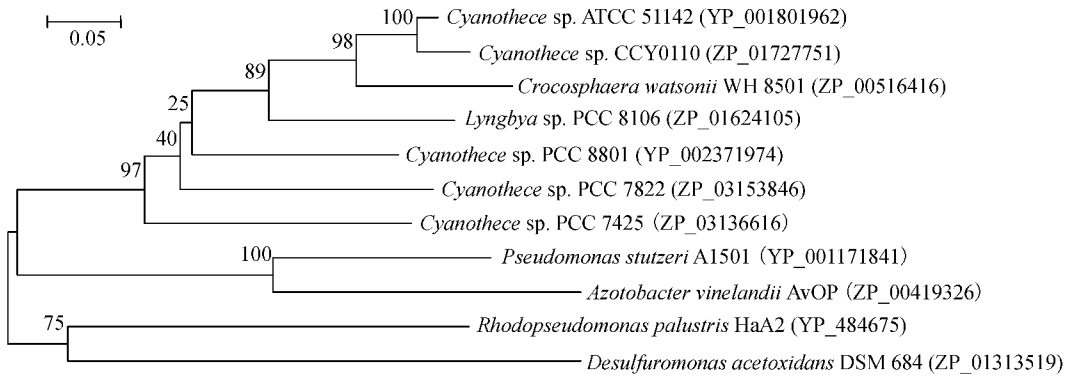


图1 不同菌属中 PST1305 编码类似蛋白同源进化分析

Fig.1 Phylogenetic tree of PST1305 from *Pseudomonas stutzeri* A1501 and related strains

2.2 PST1305 非极性整合突变株的构建

利用一种快速基因突变法^[1]构建了 PST1305 基因的非极性突变株 np1305。以 P18conF& P1305conR 为引物,从 np1305 中扩增到预期片段 740 bp,而从野生型 A1501 菌中不能扩增到相应片段,表明自杀性质粒整合到野生型 A1501 的染色体 DNA 上。

2.3 PST1305 基因转录单元的研究

基因组学分析表明:PST1305 基因与其周围的其他基因转录方向一致,基因间的间隔很小,这 6 个基因可能形成一个操纵子,它们在染色体上的排布情况如下图 2-A 所示

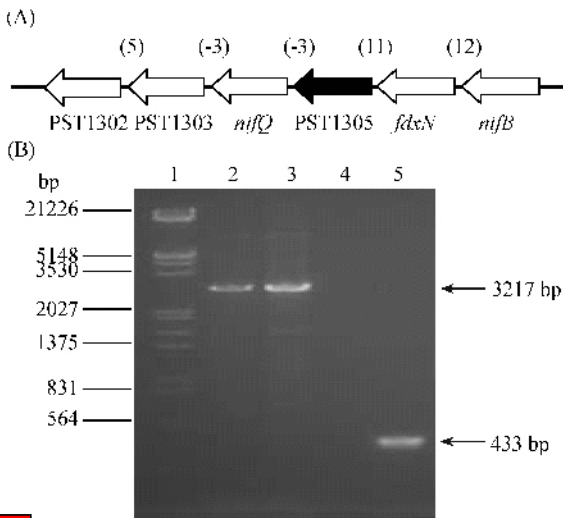


图2 PST1305 与其上下游基因在 A1501 染色体上的排布(A)及其共转录的 PCR 验证(B)

Fig.2 Organization of PST1302, PST1303, *nifQ*, PST1305, *fdxN* and *nifB* in the genome of *Pseudomonas stutzeri* A1501(A) and research on the transcription unit of PST1305 gene(B). 1. DNA marker (λDNA/HindIII + EcoRI); 2. template :cDNA, primers :P1306F&P1302R; 3. template :genomicDNA, primers :P1306F&P1302R; 4. template :cDNA, primers :P1310F&P1311R; 5. Positive control (template : genomic DNA, primers :P1310F&P1311R).

(括弧中的数字表示相邻基因间隔的碱基数,单位 bp)。在固氮条件下提取 A1501 的总 RNA,经反转录成 cDNA,利用引物对 P1306F&P1302R 进行 PCR 扩增,并利用 P1310F&P1311R 证明 cDNA 中无基因组 DNA 污染。结果表明,PST1302 ~ *nifB* 6 个基因确实位于同一个操纵单元,结果如图 2-B。

2.4 野生型 A1501、突变株 np1305、功能互补菌株 np1305 Comp 固氮酶活及生长曲线测定

为研究斯氏假单胞菌 A1501 中 PST1305 基因的突变对固氮酶活的影响,采用野生型 A1501 最适固

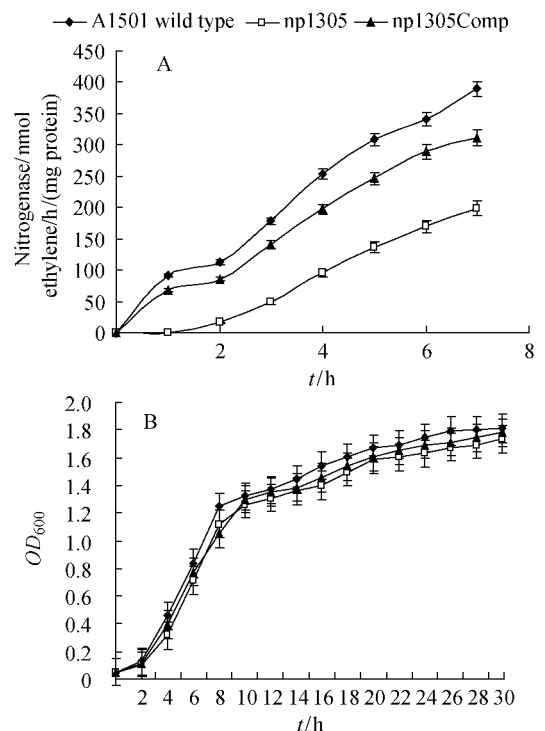


图3 野生型 A1501、np1305 以及 np1305Comp 固氮酶活(A)及的生长曲线(B)的测定

Fig.3 Time-course nitrogenase activity(A) and growth curve(B) of wild type A1501, mutant strain np1305 and functional complementary strain np1305Comp.

氮条件(0.1 mmol/L NH_4^+ 和 0.5% O_2) ,分别培养野生型 A1501、突变株 np1305 以及功能互补菌株 np1305Comp 结果如图 3-A :np1305 的固氮酶活性比野生型大幅下降,仅为野生型 A1501 的 52% ,而 np1305Comp 能部分恢复固氮酶活性,从而推测 PST1305 基因可能参与固氮,影响固氮酶的活性。为排除 PST1305 基因突变导致固氮酶活性降低是由于菌株生长状况受影响造成的,对野生型 A1501、突变株 np1305 以及功能互补菌株 np1305Comp 在基本培养基 K 中的生长进行了测定,由图 3-B 可知, A1501、np1305 以及 np1305Comp 均能正常生长,说明 PST1305 基因突变后并不影响斯氏假单胞菌的生长。

2.6 固氮和非固氮条件下, PST1305 基因表达差异的研究

在固氮条件(0.1 mmol/L NH_4^+ 和 0.5% O_2) 和非固氮条件下(20 mmol/L NH_4^+ 和 21% O_2) ,从 mRNA 的水平研究 PST1305 基因的表达量差异,以编码固氮酶的结构基因 *nifH* 作为参照,基因芯片的结果表明, PST1305 基因在固氮条件比非固氮条件下的表达明显上调 38.7 倍^[5] ,荧光实时定量 PCR 验证的结果是 28.46 ± 9.56 倍,与芯片结果基本相符,这为该基因可能参与固氮的推测提供另一证据。

3 讨论

为鉴定斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501“固氮岛”中 PST1305 基因在生物固氮过程中所起的作用,本研究通过序列比对、同源进化分析、转录水平基因表达特点的研究及突变株构建和功能互补、生理生化指标的测定,结果表明在 *P. stutzeri* A1501 中,尽管 PST1305 不是固氮所必需的(突变后并不能完全丧失固氮酶活),但它确定参与了固氮酶的最佳活性表达,可能是一个新的固氮基因,然而其具体的作用机理还有待进一步研究。

生物信息学分析表明 PST1305 含有一个磷酸盐还原酶 ArsC 的保守结构域,推测该基因来源于外源基因水平转移,插入在固氮相关基因簇中,其具体功能未知。通常在氧化还原反应过程中,必定有电子的得失,而生物固氮又与电子传递密切相关^[1]。在 *P. stutzeri* A1501 中, PST1305 基因与 PST1302、PST1303、PST1304(*nifQ*)、PST1305a(*fdxN*)、PST1306(*nifB*) 紧密连锁,形成一个操纵子,它们在棕色固氮菌 AvOP 基因组中也存在且排布方式高度保守。PST1305 基因的上游是 *fdxN* 基因,其编码产物是铁

氧还蛋白类似蛋白,该蛋白是直接的电子供体,负责将电子传递给固氮酶,在固氮过程中是必须的^[13];下游是 *nifQ* 基因,其与 *nifB*、*nifE* 及 *nifN* 在合成固氮酶的铁钼辅因子中起关键作用^[14]。据此,推测该基因可能在生物固氮的过程中参与电子向固氮酶的传递^[15]。

另外,从不同固氮菌固氮模式差异的角度来分析,好氧呼吸能供给固氮作用所需的能量,但是固氮酶在绝大多数的固氮菌中是氧敏感的,而且遇氧不可逆失活,因此固氮菌进化出不同的策略来解决氧与固氮的矛盾,好氧菌中必然存在一套防氧保护系统^[6]。模式菌 *K. pneumoniae* 只在厌氧条件下固氮,其固氮基因排列非常紧凑,无类似 PST305 的基因。斯氏假单胞菌 A1501 在微好氧的条件下固氮, PST1305 基因插入“固氮岛”中并在长期的进化过程中得以保留,必定是自然选择的结果。棕色固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 在有氧条件下可以固氮,其固氮基因簇中也排列着与 PST1305 基因相似性非常高的一个基因 AV0815,似乎暗示着 PST1305 基因可能参与 A1501 菌中固氮酶的氧防护过程。

参考文献

- [1] 丘元盛,周淑萍,莫小真,等. 水稻根际固氮细菌的研究. 科学通报(*Chinese Science Bulletin*),1980,25(21):1008.
- [2] Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, et al. The rice inoculant strain A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* strain. *Systematic and Applied Microbiology*,1999,22(2):215-224.
- [3] Jacobson MR, Brigle KE, Bennett LT, et al. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*,1989,171(2):1017-1027.
- [4] Fay P. Oxygen relations of nitrogen fixation in *Cyanobacteria*. *Microbiological Reviews*,1992,56(2):340-373.
- [5] Yan Y, Yang J, Dou Y, et al. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2008,105(21):7564-7569.
- [6] Ochman H, Moran NA. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*,2001,292(5519):1096-1099.
- [7] Schafer A, Tauch A, Jäger W, et al. 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.
- [8] Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(4) :1648 – 1652.
- [9] Allen LN, Hanson RS. Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors :identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *Journal of Bacteriology*, 1985, 161(3) :955 – 962.
- [10] Galimand M, Perroud B, Delorme F, et al. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nifE*, *nifUS* and *fixABC* in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of General Microbiology*, 1989, 135(5) :1047 – 1059.
- [11] Windgassen M, Urban A, Jaeger KE. Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 2000, 193(2) :201 – 205.
- [12] 林敏, 方宣钧, 尤崇杓. 粪产碱菌与水稻的联合过程. *核农学报(Acta Agriculturae Nucleatae Sinica)*, 1993, 7(2) :98 – 104.
- [13] Hauser F, Pessi G, Friberg M, et al. Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA + σ^{54} regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 278(3) :255 – 271.
- [14] Hernandez JA, Curatti L, Aznar CP, et al. Metal trafficking for nitrogen fixation :NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105(33) :11679 – 11684.
- [15] Rodríguez-Quinones F, Bosch R, Imperial J. Expression of the *nifBfdxNnifOQ* Region of *Azotobacter vinelandii* and its role in nitrogenase activity. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(10) :2926 – 2935.
- [16] Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. N_2 fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N_2 reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by a molybdenum-CO dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(42) :26627 – 26633.

Analysis of a new nitrogen fixation gene in *Pseudomonas stutzeri* A1501

Huili Fan, Yongliang Yan, Yan Li, Shuzhen Ping, Wei Zhang, Ming Chen, Min Lin, Wei Lu*
(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract [Objective] We studied the role of the nitrogen fixation gene PST1305 located within the nitrogen fixation island of *Pseudomonas stutzeri* A1501. **[Methods]** We constructed the mutant strain (np1305) by homologous recombination and triparental conjugation and determined the nitrogenase activity by the acetylene reduction test. Through RT-PCR, we analyzed the transcriptional units of PST1305 gene and its nearby genes. Real-Time PCR was applied to compare the expression level of PST1305 gene between optimal and non-nitrogen fixing conditions. **[Results]** Compared to the wild type, the nitrogenase activity in mutant strain (np1305) was partially decreased, however, functional complementary strain (np1305Comp) could restore nitrogenase activity close to wild type level. PST1305 gene was co-transcribed with its upstream gene (*nifB* and *fdxN*) and downstream gene (*nifQ*, PST1303 and PST1302). In contrast to the nitrogen excess conditions, expression of PST1305 under nitrogen-fixing conditions was significantly upregulated for 38.7-fold. **[Conclusion]** Disruption of PST1305 exhibited a declined nitrogenase activity compared to the wild type A1501. PST1305 gene might participate in biological nitrogen fixation by involving in the electron transport or the oxygen protection mechanism of nitrogenase. These results suggested that PST1305 gene was a new gene required for optimal nitrogenase activity of *Pseudomonas stutzeri* A1501.

Keywords : *Pseudomonas stutzeri* A1501, nitrogen fixation, quantitative Real-Time PCR, new nitrogen fixation gene

(本文责编 : 张晓丽, 谷志静)