

# 中华根瘤菌自体诱导物合成酶基因的筛选及其在大肠杆菌中的表达

汪 洋 郑会明 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** 通过携带有 mariner 转座子的质粒 pJZ290 随机插入诱变中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 建立突变子文库, 并从中筛选到自体诱导物(autoinducer, AI)部分缺失突变株 YW1。Arbitrary PCR 扩增、DNA 测序得到 YW1 基因组 DNA 中 mariner 转座子两端侧翼序列, 经 DNA 序列拼接在 GenBank 上进行同源性分析后获得一个 621bp 的完整的开放阅读框(ORF), 该 ORF 编码的酶具有 206 个氨基酸, 与草木樨中华根瘤菌(*Sinorhizobium medicae*) WSM419 的 LuxI 类自体诱导物合成酶(autoinducer synthase)TraI 的同源性高达 99%。因此, 也将该基因命名为 tra I。将该基因克隆到广宿主范围表达载体 pYC12 并在大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中成功表达, C<sub>18</sub> 反相薄层层析(TLC)在阳性重组子培养上清中检测到四种自体诱导物分子, 其中的两种正是 AI 缺失突变株 YW1 所缺失的 AI, 这些结果表明该 tra I 基因在苜蓿中华根瘤菌负责合成两种自体诱导物分子, 为进一步研究其群体感应系统奠定了理论基础。

**关键词**: *Sinorhizobium meliloti*; 群体感应; 自体诱导物合成酶; mariner 转座子

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0838-05

许多种类的细菌在高细胞密度下可以产生自体诱导物分子(autoinducer)监控细胞群体密度的变化, 从而调控细菌特定功能基因的表达, 这一现象被称为群体感应(quorum sensing)<sup>[1]</sup>。酰基高丝氨酸内酯类化合物(acylated homoserine lactone, AHL)是在革兰氏阴性细菌群体感应调控中普遍存在的信号分子<sup>[2]</sup>。迄今为止, 所有已发现的 AHL 都由一个可变的酰基链尾部与一个稳定的高丝氨酸内酯(HSL)头部相连, 不同的 AHL 分子其酰基链的长度为 4 至 18 个碳, 其第三个碳上的氢常被羟基或氧取代, 另一个改变是在酰基链上存在双键, 这种可变的酰基链尾部决定 AHL 的特异性。HSL 结构域从 S-腺苷甲硫氨酸衍生而来, 酰基链则是通过带电荷的酰基-酰基载体蛋白(acyl-ACP)或酰基-辅酶 A 来合成的<sup>[3]</sup>。LuxI 类自体诱导物合成酶, 通过将酰基-酰基载体蛋白(acyl-ACP)上的酰基侧链结合到 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的高半胱氨酸基团上, 产生特异的酰化 HSL 分子<sup>[4,5]</sup>, 这种酰化的 HSL 分子再进一步内酯化生成 AHL。AHL 介导的群体感应系统最基本的模型包括一个产生 AHL 信号分子的合成酶 LuxI 类蛋白和一个转录调节物 LuxR 类蛋白, 当 AHL 积累到阈值浓度时 R 蛋白便与 AHL 结合成复合物, 与其靶启动子序列结合, 识别特殊的启动子序列并激活特

定基因的表达<sup>[6]</sup>。目前已知群体系统能够调控细菌的多种生理生化功能如细菌与真核生物的共生、细菌毒性、细菌质粒的接合转移、抗生素的产生及生物膜的形成等<sup>[7]</sup>, 通常情况下根瘤菌的群体感应系统与根瘤菌和植物的共生作用密切相关。

以能与宿主植物紫花苜蓿共生结瘤的苜蓿中华根瘤菌为出发菌株, 利用 AHL 高效检测菌株对其 AI 产生情况进行了检测, 然后通过 mariner 转座子随机突变的方法及 Arbitrary PCR 技术筛选并鉴定了其群体感应系统中 AI 合成酶基因, 为进一步深入研究其群体感应系统及群体感应所调控的生理生化功能提供了理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** 试验所用菌株和质粒见表 1。

**1.1.2 培养基和培养条件** 根瘤菌及相关突变株采用 TY 培养基, 在 28℃ 下培养。根瘤土壤杆菌 KYC55 和 R10 分别在 AT<sup>[9]</sup>、LB 培养基中在 28℃ 下培养。*E. coli* 菌株采用 LB 培养基, 在 37℃ 下培养。所用抗生素终浓度: KYC55 所用四环素(Tc)为 2 $\mu$ g/mL; 壮观霉素(Sp)为 100 $\mu$ g/mL; 庆大霉素(Gm)为 100 $\mu$ g/mL。R10 所用四环素(Tc)为 2 $\mu$ g/mL。

基金项目 国家杰出青年基金(30325004), 国家自然科学基金(30570011), 国家 973 项目(001CB1089)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396645; E-mail: ztzhong@njau.edu.cn

作者简介 汪 洋(1981-)男, 河南人, 硕士研究生, 从事根瘤菌群体感应研究。E-mail: oceanwater@tom.com

收稿日期 2007-01-11 接受日期 2007-03-08 修回日期 2007-07-10

*E. coli* SM10 $\lambda$ pir( pJZ290 )所用氨苄青霉素( Ap )为 100 $\mu$ g/mL , 庆大霉素( Gm )为 20 $\mu$ g/mL。 *E. coli* DH5 $\alpha$ ( pYC12 )所用庆大霉素( Gm )为 20 $\mu$ g/mL。

表 1 试验所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Characteristics	Reference or Source
Bacteria strains		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Wild type	This laboratory
<i>Sinorhizobium meliloti</i> YW0	Derivative of <i>S. meliloti</i> , Spontaneous Sm <sup>r</sup>	This study
<i>Sinorhizobium meliloti</i> YW1	Derivative of YW0 mutated by mariner transposon , AI mutant	This study
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> KYC55( pJZ372 $\times$ pJZ384 $\times$ pJZ410 )	<i>A. tumefaciens</i> R10 ; Ti <sup>-</sup> bioassay strain	This laboratory <sup>[8]</sup>
<i>A. tumefaciens</i> R10( pCF218 )	Produces autoinducer 3-O-C <sub>8</sub> -HSL , as a positive control	This laboratory <sup>[9]</sup>
<i>Escherichia coli</i> SM10 $\lambda$ pir	Conjugal donor strain , Sm <sup>s</sup> , host of pJZ290	This laboratory
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Standard cloning host , host of pYC12	This laboratory
Plasmids		
pJZ290	R6K vector with a mariner transposon ( Gm <sup>r</sup> ) , Ap <sup>r</sup>	This laboratory
pYC12	BHR P <sub>tac</sub> expression vector , Gm <sup>r</sup>	This laboratory
pYW1	BHR pYC12 derivative carrying intact AI synthase gene , Gm <sup>r</sup>	This study

**1.1.3 主要试剂:** 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司 ; 邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷( o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside , ONPG ) 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷 ( 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside , X-Gal ) 购于 Sigma 公司 ; C<sub>18</sub> 反相薄层层析板购于 Merck 公司 ; Taq DNA 聚合酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒及胶回收试剂盒均购自 Promega 公司 ; 引物合成及 DNA 测序均由上海生物工程技术有限公司完成。

**1.1.4 引物:** 表 2 为实验所用引物。

表 2 Arbitrary PCR 引物序列

Table 2 Oligonucleotides used as primers

Primers	Primer sequence( 5'→3' )
Gm-1	AACCCCTACTAAAGGGAAC
Gm-2	CGGAATAGGAACITCAGACC
Km-1	GAGAACCTGCGTGAATCC
Km-2	GGACGTCGTATGGGTAAG
ARB1	GGCCACGCTCGACTAGTACNNNNNNNNNGATAT
ARB6	GGCCACGCTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC
ARB2	GGCCACGCTCGACTAGTAC

**1.2 *Sinorhizobium meliloti* YW0 的生长曲线和自体诱导物活性检测**

将 *Sinorhizobium meliloti* YW0 在 TY 培养基中的培养物每 8h 取样 , 测 OD<sub>600</sub> 值并检测上清中自体诱导物的活性。

**1.3 自体诱导物活性检测与 C18 反相薄层层析 (TLC)**

参照文献 [8] 进行操作。

**1.4 接合转移**

采用两亲接合的方法 , 受体 *Sinorhizobium meliloti* YW0 和供体 *E. coli* SM10 $\lambda$ pir ( pJZ290 ) 接合 ,

构建突变株文库。参照文献 [10] 进行操作。

**1.5 自体诱导物缺失突变株的筛选**

挑取突变株单菌落分别点种在含有 TY 液体培养基 ( 含有 Gm 和 Sm ) 的 96 孔板的各个孔内 , 在 28 $^{\circ}$ C 下培养 40 h 后 , 将每个孔内的 20 $\mu$ L 上清转移至另一新的 96 孔板中 , 并且该板的每个孔内都含有混合了检测菌株 KYC55 ( 10<sup>7</sup> cells/mL ) 和 X-Gal ( 100 $\mu$ g/mL ) 的 AT 琼脂培养基 ( 0.5% ) 。 将新的 96 孔板在 28 $^{\circ}$ C 下静置 18h 以观察 X-Gal 的水解情况。由于上清中含有的自体诱导物可诱导生物检测菌株的 *ptrA* I-*lacZ* 的表达 , 产生的  $\beta$ -半乳糖苷酶水解 X-Gal 后呈蓝色。然而 , 如果转座子的插入破坏了自体诱导物特定相关基因的表达 , 此孔将不会呈及浅的蓝色。则该孔的位置在初始 96 孔板中相对应孔里的突变株即为自体诱导物缺失突变株。

**1.6 Arbitrary PCR**

Arbitrary PCR 包括两轮 PCR 扩增反应。第一轮 PCR 所用的引物为根据 mariner 转座子的 5'→3' 端设计的特异性引物 ( Km-1→Gm-1 ) 和 2 个可以与染色体 DNA 随机结合的随机引物 ( ARB1 和 ARB6 ) 。 反应体系为 10 $\mu$ L 反应模板为 YW1 基因组 DNA , 反应条件为 : 95 $^{\circ}$ C 5min , 94 $^{\circ}$ C 30s , 30 $^{\circ}$ C 30s , 72 $^{\circ}$ C 1min , 6 个循环 ; 94 $^{\circ}$ C 30s , 55 $^{\circ}$ C 30s , 72 $^{\circ}$ C 1min , 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 5min。 第二轮 PCR 的引物为转座子 5'→3' 端的巢式引物 ( Km-2→Gm-2 ) 和随机引物 ARB2 , 反应体系为 50 $\mu$ L 并取 1 $\mu$ L 第一轮的产物作为第二轮的模板 , 反应条件为 : 94 $^{\circ}$ C 30s , 55 $^{\circ}$ C 30s , 72 $^{\circ}$ C 1min , 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 5min。 将扩增产物取 3 $\mu$ L 直接进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.7 mariner 转座子插入位点侧翼序列分析**

Arbitrary PCR 第二轮产物分别以 Gm-2, Km-2 为

相应的测序引物,提交至上海生工生物工程技术有限公司进行 DNA 测序,测序结果采用 Clone Manager Professional Suite 软件进行 DNA sequence 比对,去除转座子序列后拼接两序列并在 NCBI 数据库中 BLAST 的 translated query vs. protein database (Blastx) 在线分析比较。

## 1.8 表达质粒的构建及在大肠杆菌中的表达产物的检测

根据目的基因序列以及载体 pYC12 上的多克隆位点的特征,设计合成了以下一对引物:5'-GCGCCATATGCAGGTAATTGCAATTTTC-3' 和 5'-GCGAAGCTTAAAATCGGCAGGGA GG-3',引物上分别设计有 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点(下划线部分)并以 YW0 的基因组 DNA 为模板扩增目的基因。PCR 反应条件:30 个循环,95°C 1min,55°C 30s,72°C 1min。PCR 产物纯化后与载体 pYC12 分别经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后,经电泳检测,胶纯化回收目的片段,酶连,电转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,再通过酶切与测序验证获得阳性重组子。阳性重组子和对照 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pYC12) 培养物上清进行定量 AHL 活性显色和定性的 TLC 分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 *Sinorhizobium meliloti* YW0 的自体诱导物的定量、定性分析

在根瘤土壤杆菌的 *traR-traI* 群体感应系统中, *TraI* 负责合成 AHL 信号分子, *TraR* 为依赖于 AHL 的转录调控蛋白,一定阈值浓度的 AHL 与 *TraR* 结合形成有活性的转录调控因子,有活性的 *TraR* 与 *traI* 上游的启动子相结合正向反馈调节 *traI* 基因的表达。AHL 高效检测菌株 *A. tumefaciens* KYC55 因为敲除了自体诱导物合成酶基因 *traI* 而自身不产生自体诱导物, *PtraI-lacZ* 的表达完全依赖于外源自体诱导物的诱导,而且控制其 *traR* 表达的为 PT7 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。

AHL 是根瘤菌群体感应系统中最常使用的信号分子。为了检测苜蓿中华根瘤菌是否具有群体感应现象,利用 AHL 高效检测菌株 *A. tumefaciens* KYC55 (pJZ372)(pJZ384)(pJZ410) 对其产生自体诱导物的能力进行了检测。图 1 的结果显示, *Sinorhizobium meliloti* YW0 具有产生自体诱导物的能

力,并且 AHL 浓度随着细胞密度的增加而不断增加,在菌体密度最高时其值最大,但在菌体生长后期, AHL 含量逐渐减少,培养上清液中自体诱导物活性具有典型的依赖细胞密度的特征,具有典型的群体感应现象。

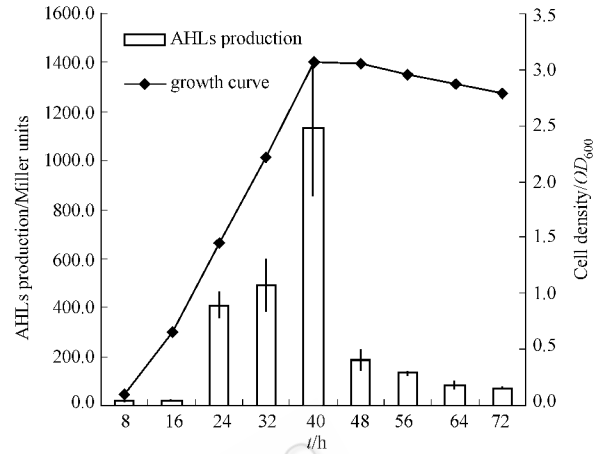


图 1 *Sinorhizobium meliloti* YW0 的生长和自体诱导物活性变化

Fig. 1 Growth curve (linearity) and AI activity curve (pillar) of *S. meliloti* YW0

根据结构不同的 AHL 在以 60% 甲醇为迁移相的  $C_{18}$  薄层层析板上的迁移率不同的原理, TLC 分析发现: *S. meliloti* YW0 可以产生 5 种不同的 AHL, 它们之间不仅存在着种类的差异而且存在着活性大小的差异(图 2)。

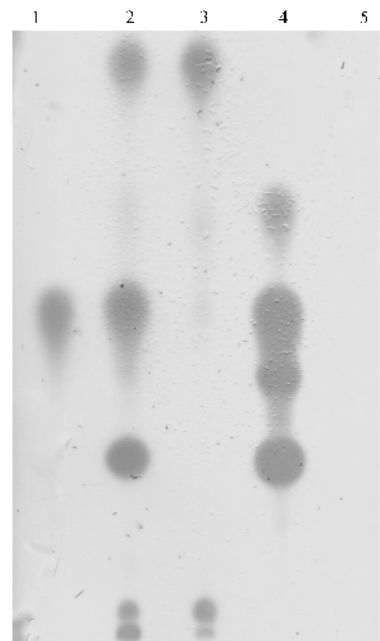


图 2 不同菌株的自体诱导物的 TLC 分析

Fig. 2 TLC analysis of autoinducers produced by different strains. 1. *A. tumefaciens* R10; 2. *S. meliloti* YW0; 3. *S. meliloti* YW1; 4. *E. coli*

## 2.2 自体诱导物缺失突变株的筛选及验证

从 3000 个接合转移突变株中筛选得到了一株自体诱导物缺失突变株并将其命名为 *S. meliloti* YW1。TLC 分析表明: AHL 突变株比野生型缺失了两种 AHL 分子,但它仍然可以产生 3 种 AHL 分子(图 2),未缺失的 3 种 AHL 分子总体活性很低,与野生型相比约降低了约 20 倍(图 3)。

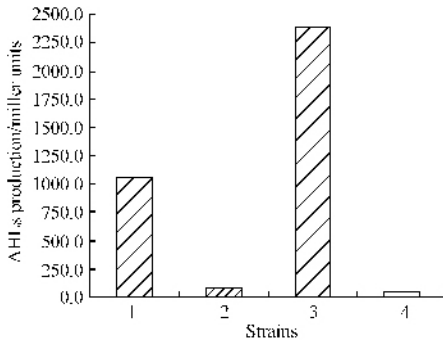


图 3 不同菌株上清中自体诱导物活性检测

Fig.3 AHL activity detection in the supernatants of different bacterial strains. 1. *S. meliloti* YW0; 2. *S. meliloti* YW1; 3. *E. coli* DH5 $\alpha$  (pYW1); 4. *E. coli* DH5 $\alpha$  (pYC12).

## 2.3 mariner 转座子插入位点侧翼序列分析

以 AI 缺失突变株 YW1 的基因组 DNA 为模板,分别以 mariner 转座子 5'和 3'端的引物进行扩增分别得到 mariner 转座子的 5'和 3'端的序列各 800bp 左右,以 YW0 为阴性对照未扩增到任何片段。经 DNA 测序,去除两序列上转座子序列、拼接后经 GenBank 序列同源性比对发现:mariner 转座子插入该开放阅读框(ORF)的 377bp 和 378bp 之间,该 ORF 由 621bp 的碱基(GenBank 登录号 EF174470)组成,编码 206 个氨基酸,与 *Sinorhizobium medicae* WSM419 中 AHL 合成酶的同源性达 99%,与 *A. tumefaciens* 和 *Rhizobium* sp. NGR234 中的 TraI 同源性达 70%,该 ORF 记作 *tra I*。

## 2.4 重组质粒构建及其在大肠杆菌中的表达产物分析

阳性重组质粒 pYW1 经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切及 DNA 测序验证可得到 621bp 的 AI 合成酶基因片段(电泳图略)。AI 合成酶基因在大肠杆菌中表达的定量检测结果表明:阴性对照 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pYC12) 上清中几乎没有 AHL 活性,而 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pYW1) 上清中的 AHL 活性约为 *S. meliloti* YW0 的 2 倍,这是由于重组质粒中的 AI 合成酶基因受 pYC12 上的强启动子 *Ptac* 控制而强表达所致(图 3)。AI 合成酶基因在大肠杆菌中表达的定性检测表明:阴性对照 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pYC12) 上清中 TLC 检

测无蓝斑,即不产生 AHL,而 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pYW1) 可产生 4 种 AHL 分子并且 TLC 检测到 4 种 AHL 分子中的 2 种正是根瘤菌 *S. meliloti* YW1 突变株所缺失的,从而证明了 *S. meliloti* YW1 突变株中 2 种 AHL 的缺失正是由于 mariner 转座子插入失活而非极性效应引起的;缺失的 2 种 AHL 是由 621bp 的 ORF 负责合成(图 2)。

## 3 讨论

对苜蓿中华根瘤菌 AI 合成酶基因的研究是通过转座子插入失活反向筛选的方法进行的,AI 缺失突变株经自体诱导物活性定量与定性检测一致表明,该 AI 缺失突变株为 AI 部分缺失突变株,它仍然可以产生 3 种自体诱导物分子,我们推测未缺失的自体诱导物分子可能是由该菌株中其它的群体感应系统中 1 种或者几种自体诱导物合成酶基因负责合成,例如豌豆根瘤菌(*Rhizobium. leguminosarum* bv *viciae*) 含有的 4 个群体感应系统(*rai*, *rhi*, *cin* 和 *tra*) 中,*cin RI*, *tra RI* 系统分别负责产生 3-OH-C<sub>14</sub>-HSL 与 3-oxo-C<sub>8</sub>-HSL,而 *rai RI*, *rhi RI* 系统则分别可以产生 3~4 种不同的 AI 分子<sup>[11~15]</sup>;而其它的 AI 合成酶基因可以通过建立基因组 DNA 文库的方法正向筛选获得。对于该 LuxI 类 AI 合成酶基因在大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  所产生不同于 AI 缺失菌株所缺失的另外 2 种 AI 的原因,可能是因为 AI 合成酶催化合成 AHL 分子所需的可变的酰基链前体在大肠杆菌与根瘤菌存在的种类不同所致。

此外,研究中发现 AI 合成酶基因下游存在着与质粒接合转移有关的 *trbB* 基因,这表明该苜蓿根瘤菌群体感应系统可能同 *A. tumefaciens* 中的 *traRI* 系统一样控制着质粒转移<sup>[9]</sup>,不过这些推论都还有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 269 - 275.
- [2] Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **25**: 365 - 404.
- [3] Watson WT, Minogue TD, Val DL, et al. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol Cell*, 2002, **9**: 685 - 694.
- [4] Park SY, Lee SJ, Oh TK, et al. AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other

- [ 5 ] Hanzelka BL , Parsek MR , Val DL , *et al.* Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* , 1999 , **181** ( 18 ) : 5766 – 5770.
- [ 6 ] Zhu J , Winans SC. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 , **96** : 4832 – 4837.
- [ 7 ] Hardman AM , Stewart GS , Williams P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* , 1998 , **7** ( 4 ) : 199 – 210.
- [ 8 ] Zhu J , Chai Y , Zhong Z , *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.
- [ 9 ] Fuqua WC , Winans SC. 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.
- [ 10 ] Chiang SL , Mekalanos JJ. Construction of *vibrio cholerae* vaccine candidate using transposon delivery and FLP recombinase-mediated excision. *Infect Immun* , 2000 , **68** ( 11 ) : 6391 – 6397.
- [ 11 ] Cubo , MT , 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** ( 12 ) : 4026 – 4035.
- [ 12 ] Lithgow JK , Wilkinson A , Hardman A , *et al.* The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* . 2000 , **37** : 81 – 97.
- [ 13 ] Rodelas B , Lithgow JK , Wisniewski-Dye F , *et al.* Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed ( *rhi* ) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* , 1999 , **181** : 3816 – 3823.
- [ 14 ] Wilkinson A , Danino V , Wisniewski-Dye F , *et al.* N-Acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* , 2002 , **184** : 4510 – 4519.
- [ 15 ] Wisniewski-Dye F , Jones J , Chhabra SR , *et al.* *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* , 2002 , **184** : 1597 – 1606.

## Screening for autoinducer synthase gene in *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the autoinducer produced by recombinant expression in *Escherichia coli*

WANG Yang , ZHENG Hui-ming , 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** : The plasmid pJZ290 containing mariner transposon was used to mutagenize *Sinorhizobium meliloti* and 3000 transposon insertion mutants were subsequently screened for autoinducer-deficient ( AI-deficient ) mutants. One AI-deficient mutant YW1 was obtained by quantitative activity assay and qualitative TLC detection. In an effort to characterize the transposon insertions of autoinducer-deficient mutant YW1 , we performed an arbitrary PCR and sequencing techniques to identify insertion sites. The sequence analysis result showed that the transposon inserted between the 277th bp and the 278th bp of one 621bp ORF in autoinducer-deficient mutant YW1. The 612-bp ORF encodes a putative protein of 206 amino acids that is highly homologous ( 99% identity ) to AHL-synthase *traI* of *Sinorhizobium medicae* WSM419. Cloned into the broad host range expression vectors pYC12 and transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  , the putative AI synthase gene was overexpressed in *E. coli* , and four different autoinducers could be detected in the supernatant of the positive recombinant strain by TLC , among which the two AHL molecules that were deficient in AI-deficient mutant YW1 could be found. All of these showed that the 621bp ORF was an AI synthase gene. This study paved the way of further studying quorum sensing systems in *S. meliloti* .

**Keywords** : *Sinorhizobium meliloti* ; quorum sensing ; autoinducer synthase ; mariner transposon

Foundation item : National Science Foundation for Distinguished Young Scholars ( 30325004 ) ; National Natural Science Foundation of China ( 30311007 ) ; Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( 001CB1089 )

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

Received : 11 January 2007 / Accepted : 8 March 2007 / Revised : 16 June 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>