



根瘤菌中甲硫氨酸亚砷还原酶底物蛋白的筛选与相互作用验证

韦曼丽, 姚演兰, 闭寒思, 郭荣兴, 何宝源, 李岚, 易弋, 黄翠姬, 侣再勇*

广西科技大学生物与化学工程学院, 广西 柳州 545006

韦曼丽, 姚演兰, 闭寒思, 郭荣兴, 何宝源, 李岚, 易弋, 黄翠姬, 侣再勇. 根瘤菌中甲硫氨酸亚砷还原酶底物蛋白的筛选与相互作用验证[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 780-794.

WEI Manli, YAO Yanlan, BI Hansi, GUO Rongxing, HE Baoyuan, LI Lan, YI Yi, HUANG Cuiji, SI Zaiyong. Screening and verification of substrate proteins of methionine sulfoxide reductase in rhizobia[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 780-794.

摘要: 根瘤菌在侵染豆科植物过程中会受到活性氧的氧化胁迫, 含甲硫氨酸的蛋白质易被氧化成甲硫氨酸亚砷导致蛋白结构和功能改变, 甲硫氨酸亚砷还原酶(methionine sulfoxide reductases, Msrs)能将甲硫氨酸亚砷还原成甲硫氨酸, 恢复蛋白的结构和功能。前期在华葵中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R 基因组中发现有 4 个 Msrs 和抗氧化压力密切相关, 但其作用机制仍不清楚。【目的】通过筛选 4 个 Msrs 的相互作用底物, 为阐明 4 个 Msrs 在 *M. huakuii* 7653R 中的作用机制提供证据。【方法】按照甲硫氨酸含量由高到低统计 *M. huakuii* 7653R 中所有蛋白的分布情况; 利用蛋白互作网站预测获得 4 个 Msrs 的候选互作底物, 将预测互作底物进行功能注释基因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)代谢通路分析; 通过细菌双杂交初步验证它们之间的相互作用。【结果】甲硫氨酸含量百分数分布基本呈正态分布形式, 位于中间百分数的蛋白最多, 位于两边的蛋白较少; 筛选获得有 6 个抗氧化酶和 6 个转录调控因子是 4 个 Msrs 的候选互作底物; 细菌双杂交显示, 有 2 个抗氧化酶和 5 个转录调控因子确实和 4 个 Msrs 存在不同程度的相互作用。【结论】为阐明 Msrs 在根瘤菌 *M. huakuii* 7653R 中抵抗氧化压力的作用机制提供了证据, 为揭示根瘤菌抵抗活性氧提供了新的思路 and 方向。

关键词: 活性氧; 甲硫氨酸亚砷还原酶; 根瘤菌; 氧化胁迫; 细菌双杂交; 互作底物

资助项目: 广西自然科学基金(2023GXNSFAA026398); 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目(2022KY0347); 广西大学生创新创业训练计划(S202110594128); 广西科技大学博士基金(校科博 20Z33)

This work was supported by the Guangxi Provincial Natural Science Foundation (2023GXNSFAA026398), the Guangxi Colleges and Universities Young and Middle-aged Teachers' Basic Scientific Research Ability Improvement Project (2022KY0347), the Guangxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Funding Project (S202110594128), and the Ph.D. Programs Foundation of the Guangxi University of Science and Technology (xiaokebo 20Z33).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-772-2686670, E-mail: sizaiyong@163.com

Received: 2023-08-05; Accepted: 2023-09-15; Published online: 2023-09-20

Screening and verification of substrate proteins of methionine sulfoxide reductase in rhizobia

WEI Manli, YAO Yanlan, BI Hansi, GUO Rongxing, HE Baoyuan, LI Lan, YI Yi, HUANG Cuiji, SI Zaiyong*

School of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, Guangxi, China

Abstract: Rhizobia would encounter oxidative stress of reactive oxygen species (ROS) in the process of infecting leguminous plants. Methionine-containing proteins are easy to be oxidized to methionine sulfoxide, leading to changes in protein structure and function. Methionine sulfoxide reductases (Msrs) can reduce methionine sulfoxide to methionine, restoring protein structure and function. We have identified four Msrs in the genome of *Mesorhizobium huakuii* 7653R that are involved in oxidative stress response, while the mechanism remains unclear. **[Objective]** To identify the substrates of four Msrs and elucidate the roles of the four Msrs in *M. huakuii* 7653R. **[Methods]** According to the methionine content, we determined the distribution of all the proteins in *M. huakuii* 7653R. Then, we used the online protein interaction prediction tools to predict the substrates of the four Msrs, and performed gene ontology (GO) functional annotation and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment for the predicted substrates. Finally, we verified the interaction between them by using the bacterial two-hybrid system. **[Results]** The methionine content followed the normal distribution, with most proteins in the middle and few proteins on both sides. Six antioxidant enzymes and six transcription factors were selected as the candidate substrates of the four Msrs. Finally, the bacterial two hybrid results showed that two antioxidant enzymes and five transcription factors can interact with the four Msrs to different degrees. **[Conclusion]** We provided the proof in illustrating the role of Msrs in the oxidative stress response to *M. huakuii* 7653R and provided a new idea for the research on the mechanism of rhizobia in response to ROS.

Keywords: reactive oxygen species; methionine sulfoxide reductase; rhizobia; oxidative stress; bacterial two-hybrid system; interacting substrates

生物固氮指在固氮酶的催化作用下, 将空气中的氮气还原为能被代谢利用的氨态氮(NH₃)形式的过程。生物固氮包括自生固氮体系、豆科植物与根瘤菌互利共生的固氮体系和固氮螺菌属与禾本科植物形成的联合固氮体系。其中豆科植物与根瘤菌形成的共生固氮体系是生物固氮的重要组成部分。在根瘤菌-豆科植物共生

体系建立的过程中, 活性氧能作为抗菌剂抵抗根瘤菌入侵, 又能作为根瘤器官发育的起始的信号分子^[1]。活性氧能调节许多发育过程, 例如细胞的增殖和分化、细胞程序性死亡、种子发芽、向地性、根毛生长、花粉管发育和衰老等^[2]。同时活性氧也能引起生物大分子的氧化破坏, 例如脂质、蛋白质和核酸的氧化导致结

构、功能活性发生改变^[3]。在根瘤菌侵染豆科植物根毛细胞的早期，豆科植物会产生大量的活性氧来抵抗根瘤菌的入侵，特别是含硫氨基酸甲硫氨酸特别容易受到活性氧的氧化，甲硫氨酸氧化后生成 *S*-型甲硫氨酸亚砷和 *R*-型甲硫氨酸亚砷，能分别被 A 型甲硫氨酸亚砷还原酶 (methionine sulfoxide reductase A, MsrA) 和 B 型甲硫氨酸亚砷还原酶 (methionine sulfoxide reductase B, MsrB) 还原成甲硫氨酸从而恢复底物蛋白的活性^[4]。

细菌为了抵抗氧化压力，经过长期进化出一系列的抗氧化装置来抵抗氧化压力^[5-7]。其中甲硫氨酸亚砷还原酶 (methionine sulfoxide reductase, Msrs) 就是其中的一种。甲硫氨酸亚砷还原酶广泛存在于细菌、酵母、哺乳动物和植物中。植物中具有多拷贝数的 *msrs*，并且它们有不同的组织表达特征和不同亚细胞定位特征，植物与细菌和动物相比甲硫氨酸亚砷还原酶会有多种功能，比如在应对生物和非生物胁迫和对植物器官发育起到重要作用^[8]。查找文献发现，在细菌中甲硫氨酸亚砷还原酶通过改变细菌的黏附性、生物膜形成以及运动性、存活能力、抗氧化性和毒力来影响病原菌的感染能力^[8]。在绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中 *msrA* 和 *msrB* 突变后对次氯酸钠和双氧水变得更为敏感，毒力有所下降^[9]。*msrA* 参与到大肠杆菌和戈登氏链球菌生物膜的形成，并且大肠杆菌的 *msrA* 在生物膜合成时受到诱导表达^[10-11]。植物病原菌菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 中的 *msrA* 缺失后，在平板上的运动性减弱^[12]。血液链球菌 (*Streptococcus sanguis*) 中 *msrA* 突变后，不能黏附血小板或者不能让血小板聚集^[13]。耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中 *msrA* 突变后在巨噬细胞中的存活能力显著降低^[14]。虽然甲硫氨酸亚砷还原酶在病原菌侵染宿主过程

中有重要功能，但其具体的作用机制仍不清楚。

为阐明甲硫氨酸亚砷还原酶的作用机制，筛选其作用底物是一种有效的方法。目前筛选作用底物的方法有预测法、亲和层析法、细菌 (酵母) 双杂交筛选法和在甲硫氨酸亚砷还原酶基因上调或者下调的物种中寻找变化的基因。蛋白中甲硫氨酸含量越高，越有可能成为其底物^[15-16]，另外可以通过蛋白互作网站进行底物蛋白的筛选 (<http://sbi.imim.es/iLoopsServer/index.php/init.html>)。在拟南芥中通过亲和层析的方法鉴定出 24 个与 AtMsrB1 相互作用的蛋白，这些蛋白参与光合作用、转录、氧化压力以及氨基酸和糖的代谢^[17]。由于蛋白质中 MetO 含量的变化，引起这些蛋白稳定性改变，所以与 Msrs 互作的蛋白会在 *msrs* 上调或者下调的株系中表现出不同的丰度^[18]。

华葵中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 7653R 是陈华葵院士早期分离的一种根瘤菌，与紫云英 (*Astragalus sinicus*) 有着专一的共生关系，能形成不定型瘤^[19]。紫云英是豆科黄芪属，二年生草本植物，俗名草子、红花草，是我国稻田最主要的冬季绿肥作物。实验室早期发现根瘤菌 *M. huakuii* 7653R 基因组中有 4 个甲硫氨酸亚砷还原酶基因 *MCHK_3347*、*MCHK_5276*、*MCHK_5689* 和 *MCHK_5902*，分别编码 MsrA1、MsrB1、MsrA2 和 MsrB2，这 4 个基因与抵抗氧化压力密切相关。为阐明 4 个甲硫氨酸亚砷还原酶的作用机制，首先通过蛋白互作网站分别得到它们的候选底物，然后通过 GO 功能分析和 KEGG 代谢通路分析获得可能互作的抗氧化酶和转录因子，根据实验室 *M. huakuii* 7653R 接种紫云英的转录组数据，筛选得到 6 个抗氧化酶基因和 6 个转录因子基因，并通过细菌双杂交技术进行了验证。本研究结果有助于阐明甲硫氨酸亚砷还原酶在共生过程中抵抗氧化压力

的作用机制, 为进一步揭示根瘤菌抵抗活性氧的机制提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

根瘤菌 *Mesorhizobium huakuii* 7653R、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* XL1-Blue (pBT-*msrA1/mrsB1/msrA2/msrB2*)报告菌株, 实验室保存。质粒 pMD-19T、pTRG 等, 购自 TaKaRa 公司; 基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, 限制性内切酶购自 SibEnzyme 公司。

TY 培养基、LB 培养基、细菌双杂交非选择性培养基 NSSM 和选择性培养基 DSSM 参考文献[20]配制。

1.2 预测网站筛选 Msrs 的底物蛋白

将 *M. huakuii* 7653R 中的 6 325 个蛋白在蛋白互作预测网站(<http://sbi.imim.es/iLoopsServer/index.php/init.html>)进行预测, 筛选出根瘤菌中与 MsrA1、MsrA2、MsrB1 和 MsrB2 可能互作的所有蛋白。将可能互作的底物蛋白在韦恩图在线制作网站(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)获得 Msrs 底物蛋白预测结果的韦恩图。

1.3 底物蛋白 GO 分析和 KEGG 代谢通路分析

底物蛋白 GO 分析和 KEGG 代谢通路分析在上海美吉生物云(<http://cloud.majorbio.com>)上进行。分别和 GO 数据库^[21]、KEGG 数据库^[22]进行 BLAST ($E_value < 1e^{-5}$)比对, 从而获得底物蛋白序列的功能注释信息。

1.4 引物设计

将基因序列从 NCBI 下载后, 用引物设计软件 Primer 5 设计引物, 并加上合适的限制性酶切位点, 送至南京金斯瑞生物有限公司合成

引物, 本研究所用引物见表 1。

1.5 PCR 产物扩增及测序

扩增采用 40 μ L 体系: 10 \times 缓冲液 4 μ L, ddH₂O 13.9 μ L, 模板 2 μ L, dNTPs Mixture 2 μ L, 酶 0.2 μ L, 上游引物 2 μ L, 下游引物 2 μ L。PCR 反应体系: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 25 $^{\circ}$ C 10 min。回收电泳检测产物大小, 将产物与载体 pMD19-T 连接并转化 *E. coli* DH5 α , 送武汉天一华煜基因科技有限公司进行测序。

1.6 重组质粒的构建及酶切验证

将测序正确的基因片段用限制性内切酶切下并回收, 与相同限制性内切酶酶切后线性化的载体 pTRG 在 T4 连接酶作用下进行酶连, 转化 *E. coli* DH5 α , 经 PCR 验证正确后, 提取重组质粒。

重组质粒按相应的限制性内切酶酶切质粒(酶切体系: 质粒 20 μ L, 10 \times SS Buffer 4 μ L, RNase A 1 μ L, ddH₂O 13 μ L, 2 种限制性内切酶各 1 μ L), 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。电泳观察结果。酶连: 酶切后 pTRG 质粒和目的基因片段配酶连体系(10 μ L: 目的基因 4.5 μ L, pTRG 载体 2.5 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, T4 连接酶 1 μ L), 16 $^{\circ}$ C 酶连过夜。采用钙转化法转化大肠杆菌感受态, 并筛选转化子, 用 pTRG 引物 PCR 验证。筛选验证正确的转化子接入液体 LB 中(培养基加链霉素), 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜, 菌体保存备用。

1.7 细菌双杂交实验

按文献方法配制细菌双杂交培养基^[20], 将验证正确的转化菌株和正、负对照的转化菌株接入 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜; 取 1 mL 菌液, 5 000 r/min 离心 3 min, 弃上清加 1 mL 无菌水清洗 2 次后加入 1 mL 无菌水重悬, 重悬后的菌液梯度稀释为 10⁻¹–10⁻⁵; 吸取 5 μ L 制备好的点样菌液, 分别在非选择性

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction enzyme
<i>MCHK_RS14825-F</i>	CGGGATCCATGACTGAACCGCTCAAGGT	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS14825-R</i>	GGAATTCTTAGGCGGCGGGCGC	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS27745-F</i>	CGGGATCCATGACGCCGACGACATC	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS27745-R</i>	GGAATTCTCATCTTTCCAGACATTCTCTCAGT	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS24415-F</i>	GGAATTCATGATGGAAGACACGGCAGG	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS24415-R</i>	GACTAGTTTAGGCGGCCGTCGCC	<i>Spe</i> I
<i>MCHK_RS12835-F</i>	CGGGATCCATGCGTCCACAATTTGCTT	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS12835-R</i>	GGAATTCTCAAGGATTGAGGCGTCG	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS31475-F</i>	CGGGATCCATGAAATATCTCCTTGATCGAACG	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS31475-R</i>	GGAATTCTCATCTGCGAATGACGGAAGA	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS07270-F</i>	CGGGATCCATGACGATTCACCATCAGGC	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS07270-R</i>	GGAATTCCTAGAGGTCGAGATCCCACGT	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS23945-F</i>	CGGGATCCATGAGCCTTCGTATCAACGACAT	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS23945-R</i>	CGGAATTCTCAGGCGGACGGCTGTTT	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS08640-F</i>	CGGGATCCATGGCTGACCTCGACGTGG	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS08640-R</i>	CCGCTCGAGTCAAAGCGCGCGAACGG	<i>Xho</i> I
<i>MCHK_RS19040-F</i>	CGGGATCCATGTCTCTTCGTATCGCCGAC	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS19040-R</i>	CGGAATTCTCAGGCGTTGCTGTGAGG	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS30180-F</i>	CGGGATCCATGCTCAAGTCAAACTGAATGTCA	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS30180-R</i>	CGGAATTCTCACTGCGACTTCGCCTTG	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS31355-F</i>	CGGGATCCATGACCGGTCAAAGAAGGTTT	<i>Bam</i> H I
<i>MCHK_RS31355-R</i>	CCGCTCGAGTCATGCTGCGTCTTCAATG	<i>Xho</i> I
<i>MCHK_RS16105-F</i>	CGGAATTCATGACGACAGGACGAGGCA	<i>Eco</i> R I
<i>MCHK_RS16105-R</i>	CCGCTCGAGTCAGTTCGCTGGGCCCG	<i>Xho</i> I
<i>pTRG-F</i>	TGGCTGAACAACCTGGAAGCT	
<i>pTRG-R</i>	ATTCGTCGCCCCCATAA	
<i>pBT-F</i>	TCCGTTGTGGGGAAAGTTATC	
<i>pBT-R</i>	GGGTAGCCAGCAGCATCC	

平板 NSSM 和选择性平板 DSSM 中对应网格位置轻轻打出菌液；点样完后的平板用正置避光放置，平板上的菌液干后倒置放于 37 °C 培养箱中避光培养 16–48 h 后观察结果。

1.8 分子生物学相关操作

细菌总 DNA 提取、PCR 扩增检测及回收、质粒的提取和酶切、酶连和转化等相关分子生物学操作参考《精编分子生物学实验指南，第五版》。

2 结果与分析

2.1 统计 *M. huakuii* 7653R 中所有蛋白含甲硫氨酸个数百分含量

根据文献报道，蛋白质中含有甲硫氨酸含量越高或者富含甲硫氨酸的结构域，越有可能是甲硫氨酸亚砷还原酶的底物^[23]，因此将 *M. huakuii* 7653R 中所有蛋白按照所含甲硫氨酸氨基酸个数的百分含量排序。*M. huakuii* 7653R

中有 6 325 个含甲硫氨酸的蛋白, 按照甲硫氨酸含量的百分比进行从高到低排序, 并统计不同区间甲硫氨酸含量的蛋白个数, 根据统计结果作图(图 1), 结果显示甲硫氨酸含量落在区间 2.0%–2.5%的蛋白个数最多, 甲硫氨酸含量落在区间>10%的蛋白个数最少; 甲硫氨酸含量在区间 1.5%–3.5%的蛋白占 *M. huakuii* 7653R 总蛋白个数的 65.09%; 整体结果显示甲硫氨酸含量百分数分布基本呈正态分布形式, 位于中间百分数的蛋白最多, 位于两边的蛋白较少。

2.2 预测 *M. huakuii* 7653R 中 4 个 Msrs 底物蛋白

按照 1.2 的预测方法, 将 *M. huakuii* 7653R 中的蛋白分别与 4 个 Msrs 在蛋白互作网站进行

预测[结果见国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmDC.cn>), 编号: NMDCX0000231], 并做 Msrs 底物蛋白预测结果的韦恩图(图 2), 结果显示与 4 个 Msrs 互作的蛋白共有 2 620 个, 其中与 MsrA1 互作的蛋白有 1 530 个, 与 MsrB1 互作的蛋白有 2 039 个, 与 MsrA2 互作的蛋白有 2 276 个, 与 MsrB2 互作的蛋白有 2 205 个; 有 1 059 个蛋白都与 4 个 Msrs 存在相互作用; 有 897 个蛋白与 3 个 Msrs 存在相互作用; 有 459 个蛋白与 2 个 Msrs 存在相互作用; 有 205 个蛋白与 1 个 Msr 存在相互作用; 有 7、56、63 和 79 个蛋白分别只和 MsrA1、MsrB1、MsrA1 和 MsrB2 存在相互作用。结果表明, 预测的互作底物和不同 Msrs 的相互作用存在差异。

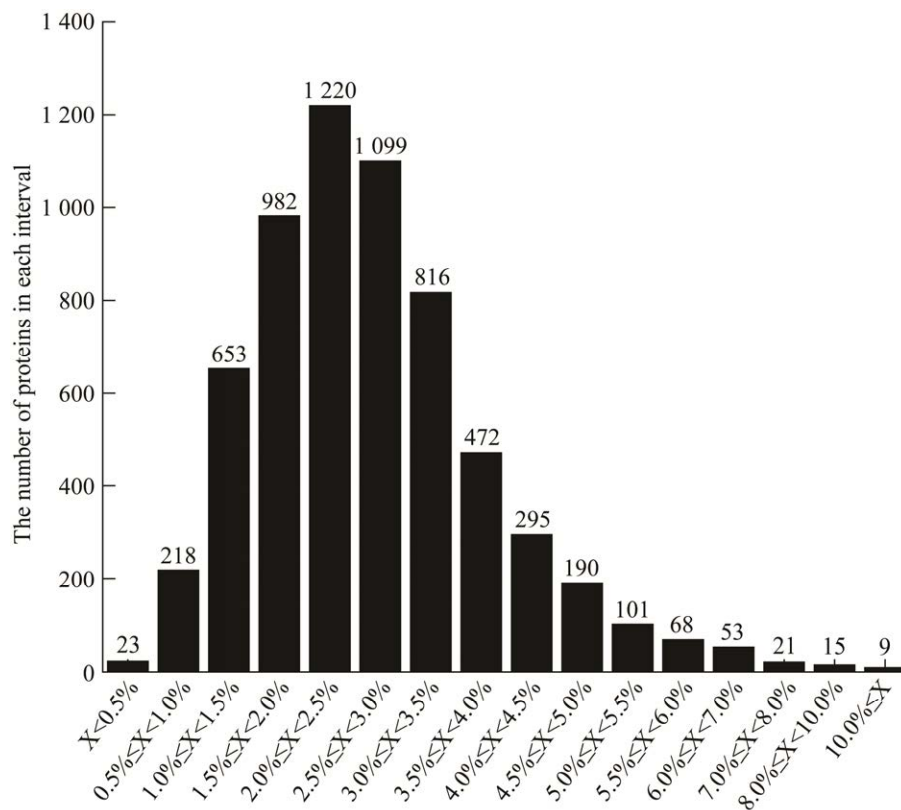


图 1 在不同甲硫氨酸含量百分数区间内的蛋白个数统计

Figure 1 Statistics of the number of proteins within different percentage intervals of methionine content.

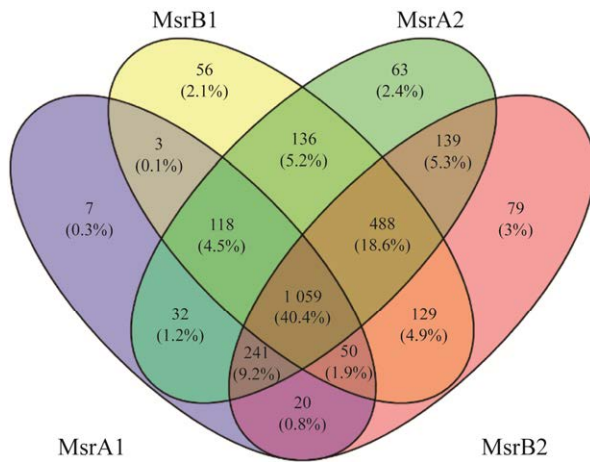


图 2 Msrs 底物蛋白预测结果的韦恩图

Figure 2 Venn diagram of Msrs substrate protein prediction results. The protein interacting with MsrA1 is in the blue ellipse. The protein interacting with MsrB1 is located in the yellow ellipse. The protein interacting with MsrA2 is located in the green ellipse. The protein that interacts with MsrB2 is located in the red ellipse. The intersection of two ellipses indicates interaction with two Msrs, the intersection of three ellipses indicates interaction with three Msrs, and the intersection of four ellipses indicates interaction with four Msrs.

2.3 预测蛋白的 GO 分析和 KEGG 分析

将得到的底物蛋白进行功能 GO 聚类分析和 KEGG 代谢通路分析, 功能 GO 聚类分析结果表明, 这些蛋白主要集中在生物过程、细胞组成和分子功能三大部分, 其中分子功能主要聚集在催化活性、结合能力、转录调节活性、转运活性以及抗氧化活性, 这暗示了甲硫氨酸亚砷还原酶可能通过改变这些酶的活性来影响生命活动(图 3)。互作蛋白 KEGG 代谢通路分析结果显示, 最多的是氨基酸代谢、碳代谢、膜转运和细胞群落原核生物, 结果表明和 Msrs 互作的底物蛋白参与到各种各样的代谢通路(图 4)。

2.4 候选底物抗氧化酶与转录因子的筛选

通过 GO 功能分析得到 166 个转录因子和 14 个抗氧化酶是根瘤菌中 4 个 Msrs 的候选底物, 实验室前期分析了根瘤菌 *M. huakuii* 7653R 在自生条件和接种紫云英后共生条件下, 根瘤菌中基因的转录组数据。共生条件相比于自生条件下, 将这些根瘤菌基因上调表达倍数较高的

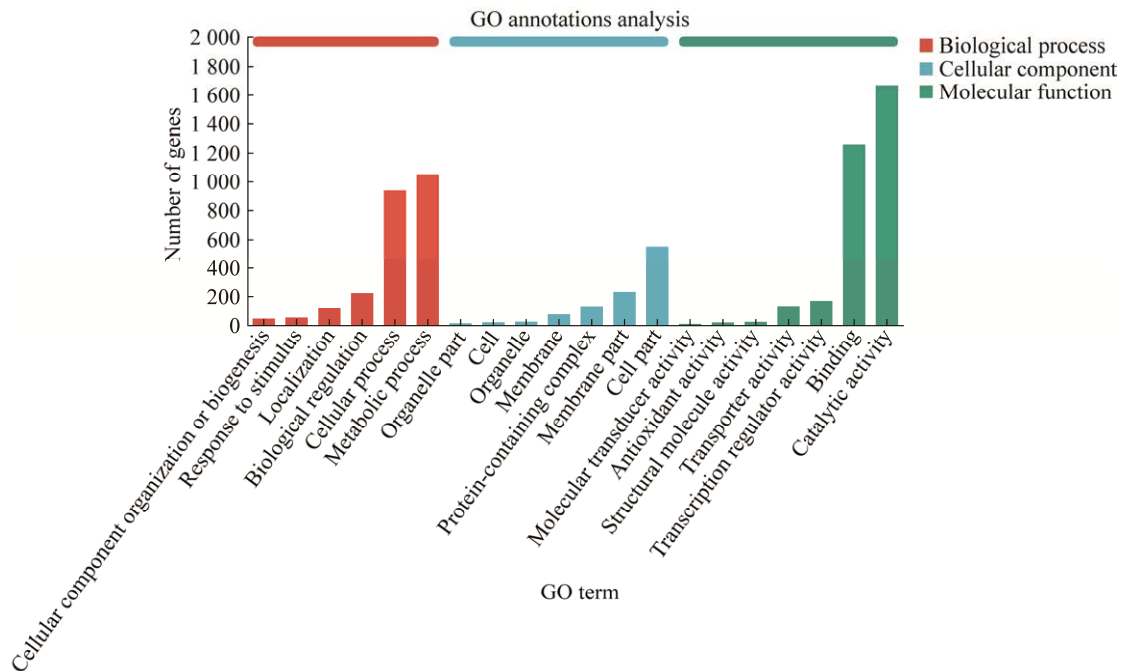


图 3 互作蛋白功能注释 GO 分析

Figure 3 GO analysis of functional annotation of interacting proteins.

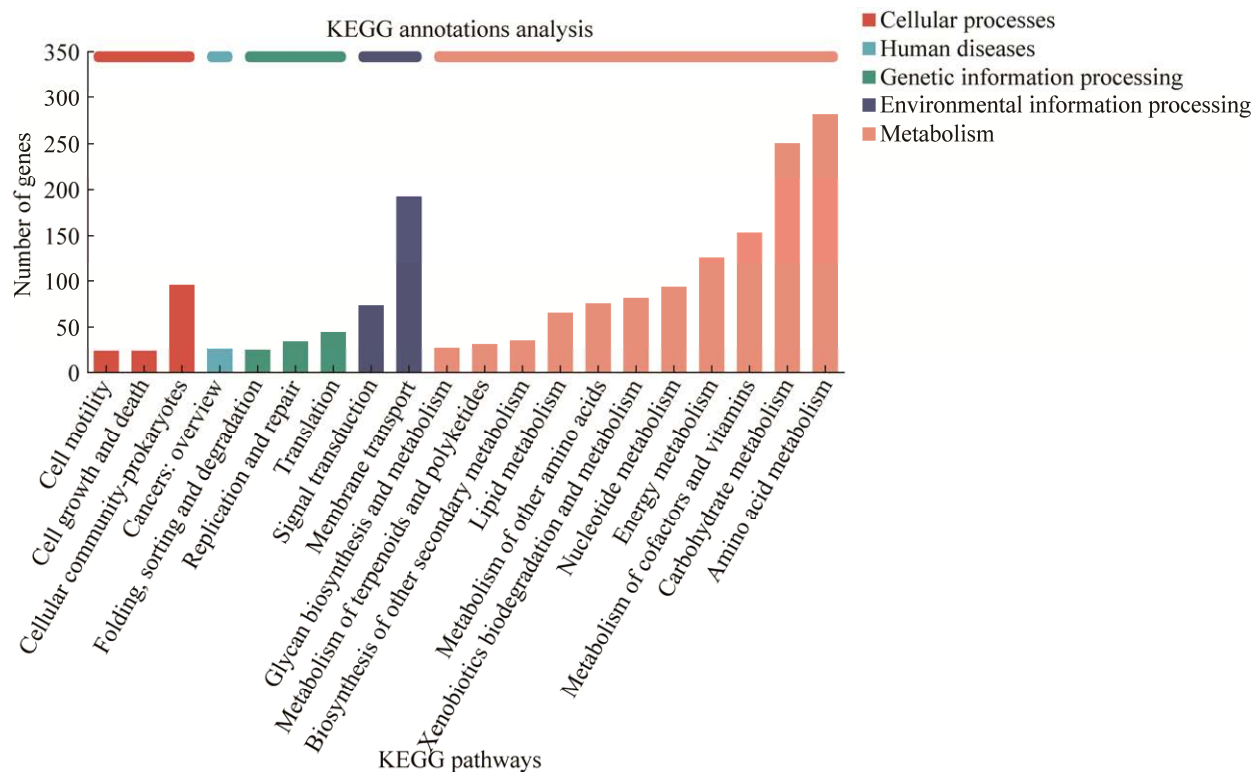


图 4 交互蛋白 KEGG 代谢通路分析

Figure 4 Analysis of the KEGG metabolic pathway of interacting proteins.

转录因子和抗氧化酶作为候选基因。将上调前 6 位的基因作为研究对象。候选抗氧化酶基因和转录因子的编号、长度、类型、氨基酸个数、甲硫氨酸含量与上调倍数见表 2 和表 3。

2.5 抗氧化酶与转录因子基因的扩增和重组载体的构建

提取 *M. huakuii* 7653R 基因组, 用 Primer 5 设计抗氧化酶和转录因子的引物进行 PCR 扩增, 经过琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示抗氧化酶基因都扩增出了和预测大小一致的条带; 转录因子基因有 1 个没有扩增出来, 可能原因是基因结构复杂, 设计的引物多次优化后仍没有扩增到目的条带(图 5A、5B)。将扩增出的基因进行回收, 连接到 pMD-19T 载体上, 然后测序正确后 [测序结果见国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmdc.cn>), 编号: NMDCX0000231] 经过

双酶切、回收酶连到载体 pTRG 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经 PCR 验证后提取质粒进行双酶切验证, 结果显示从重组质粒中双酶切得到了大小正确的抗氧化酶基因和转录因子基因(图 5C、5D)。

2.6 细菌双杂交验证甲硫氨酸亚砷还原酶与底物蛋白的互作

提取验证后的重组质粒, 分别转化到含有诱饵质粒 pBT-*msrA1/mrsB1/msrA2/msrB2* 的报告菌株 *E. coli* XL1-Blue 中, 经过菌落 PCR 验证, 将同时含有诱饵和猎物重组质粒的报告菌株保存于甘油管备用。将菌活化后分别点板到 NSSM 平板和 DSSM 平板, 其中 NSSM 平板为非选择性平板, 含有 pTRG 质粒和含有 pBT 质粒的菌株可以生长, DSSM 为选择性平板, 只有存在相互作用才在上面生长。甲硫氨酸亚砷还原酶

表 2 与 Msrs 互作的候选抗氧化酶基因

Table 2 Candidate antioxidant enzyme genes interacting with Msrs

Gene ID	Length (bp)	Description	Amino acid	Methionine content ^a (%)	Up-regulation fold change ^b
<i>MCHK_RS31335</i>	534	Peroxidase	177	2.82 (5)	96.52
<i>MCHK_RS23945</i>	660	Peroxidase	219	2.28 (5)	15.55
<i>MCHK_RS30180</i>	480	Decarboxylase	159	3.14 (5)	6.06
<i>MCHK_RS16105</i>	1 281	Catalase	426	1.17 (5)	3.35
<i>MCHK_RS08640</i>	468	Peroxidase	155	1.93 (3)	3.09
<i>MCHK_RS19040</i>	669	Peroxidase	222	3.60 (8)	1.14

^a: Methionine content=the number of methionine/the number of amino acids×100%, and the number in parentheses represents the number of methionine residues in the protein. ^b: Up-regulation=the transcription level of the gene in the root nodules of *Astragalus sinicus* inoculated with *Mesorhizobium huakuii* 7653R for 28 days/the transcription level of the gene in *M. huakuii* 7653R under the autogenous conditions.

表 3 与 Msrs 互作的候选转录因子基因

Table 3 Candidate transcription factor genes interacting with Msrs

Gene ID	Length (bp)	Description	Amino acid	Methionine content ^a (%)	Up-regulation fold change ^b
<i>MCHK_RS14825</i>	447	Response regulator	148	4.05 (6)	18.86
<i>MCHK_RS27745</i>	540	RNA polymerase factor	179	2.78 (5)	13.48
<i>MCHK_RS24415</i>	864	RNA polymerase factor	287	4.18 (12)	11.42
<i>MCHK_RS12835</i>	825	AraC family transcription regulatory factor	274	1.82 (5)	6.31
<i>MCHK_RS31475</i>	444	Lrp/AsnC family transcription regulatory factor	147	2.72 (4)	6.10
<i>MCHK_RS07270</i>	951	GNAT family N-acetyltransferases	316	0.60 (2)	5.60

^a: Methionine content=the number of methionine/the number of amino acids×100%, and the number in parentheses represents the number of methionine residues in the protein. ^b: Up-regulation=the transcription level of the gene in the root nodules of *Astragalus sinicus* inoculated with *Mesorhizobium huakuii* 7653R for 28 days/the transcription level of the gene in *M. huakuii* 7653R under the autogenous conditions.

和抗氧化酶相互作用点板结果如图 6 所示。结果表明 1 个过氧化物酶 (GenBank ID: *MCHK_RS31335*) 和过氧化氢酶 (GenBank ID: *MCHK_RS16105*) 与 4 个甲硫氨酸亚砷还原酶互作, 而其他 4 个均不互作; 甲硫氨酸亚砷还原酶和转录因子相互作用点板结果如图 7 所示, 结果显示 5 个转录因子和 4 个甲硫氨酸亚砷还原酶存在不同程度的相互作用。

3 讨论与结论

本研究综合蛋白互作网站和功能注释 GO 分析和 KEGG 代谢通路分析, 然后参考中慢生

根瘤菌-紫云英共生的转录组数据, 筛选得到与中慢生根瘤菌 *M. huakuii* 7653R 中甲硫氨酸亚砷还原酶相互作用的 6 个抗氧化酶基因和 6 个转录调控因子基因, 最后经过细菌双杂交技术验证得到 1 个过氧化物酶 (GenBank ID: *MCHK_RS31335*) 和 1 个过氧化氢酶 (GenBank ID: *MCHK_RS16105*) 与甲硫氨酸亚砷还原酶存在相互作用; 2 个 RNA 转录酶因子 (GenBank ID: *MCHK_RS27745*, *MCHK_RS24415*)、1 个 AraC 家族转录调节因子 (GenBank ID: *MCHK_RS12835*)、1 个 Lrp/AsnC 家族转录调控因子 (GenBank ID: *MCHK_RS31475*) 和 1 个 GNAT 家族 N-乙酰转

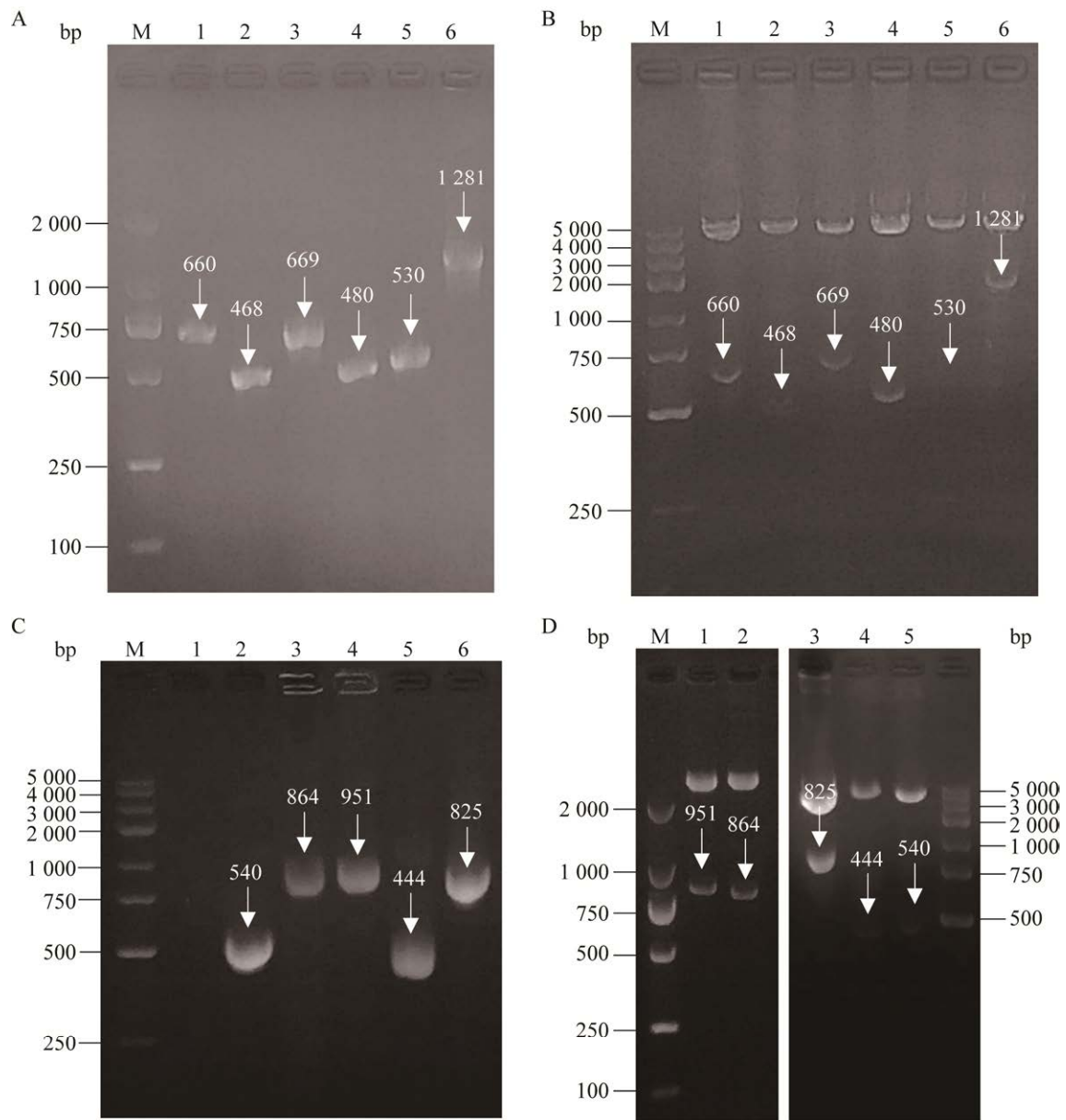


图 5 抗氧化酶与转录因子基因的扩增和重组载体的验证

Figure 5 Amplification of antioxidant enzyme and transcription factor genes and validation of recombinant vectors. A: Amplification of antioxidant enzyme genes. M: 2 000 bp marker; 1: *MCHK_RS23945*; 2: *MCHK_RS08640*; 3: *MCHK_RS19040*; 4: *MCHK_RS30180*; 5: *MCHK_RS31355*; 6: *MCHK_RS16105*. B: Enzymatic digestion validation of antioxidant enzyme genes connected to vector pTRG. M: 2 000 bp plus marker; 1: *MCHK_RS23945*; 2: *MCHK_RS08640*; 3: *MCHK_RS19040*; 4: *MCHK_RS30180*; 5: *MCHK_RS31355*; 6: *MCHK_RS16105*. C: Amplification of transcription genes. M: 2 000 bp plus marker; 1: *MCHK_RS14825*; 2: *MCHK_RS27745* (540 bp); 3: *MCHK_RS24415* (864 bp); 4: *MCHK_RS7270*; 5: *MCHK_RS31475* (444 bp); 6: *MCHK_RS12835* (825 bp). D: Enzymatic digestion validation of transcription genes connected to vector pTRG. M: 2 000 bp marker; 1: *MCHK_RS7270*; 2: *MCHK_RS24415*; 3: *MCHK_RS12835*; 4: *MCHK_RS31475*; 5: *MCHK_RS27745*. Arrows indicate the stripe position, numbers indicate the stripe size.



图 6 Msrs 和抗氧化酶细菌双杂交结果

Figure 6 Bacterial two-hybrid assay for the interaction Msrs and antioxidant enzyme.



图 7 MsrA 和转录因子细菌双杂交结果

Figure 7 Bacterial two-hybrid assay for the interaction MsrA and transcription factor.

移酶(GenBank ID: *MCHK_RS07270*)与甲硫氨酸亚砷还原酶存在相互作用。实验结果表明蛋白互作网站得到的互作底物蛋白要结合其他方法进一步验证。

蛋白质中的甲硫氨酸残基是最容易被氧化的氨基酸之一，作为蛋白内源的抗氧化剂，并

且处于蛋白表面的甲硫氨酸残基更容易受到活性氧的氧化，处于活性部位附近的甲硫氨酸残基不易被氧化^[24-25]。文献报道蛋白质中甲硫氨酸含量越高，该蛋白越有可能是甲硫氨酸亚砷还原酶的底物^[15-16]，将 *M. huakuii* 7653R 中所有的蛋白质按照甲硫氨酸残基含量百分数进行

了排序(图 1), 结果显示基本按正态分布排列。从 6 个抗氧化酶中的甲硫氨酸残基含量来看, 脱羧酶(Gene ID: *MCHK_RS30180*, 甲硫氨酸残基含量 3.14%)和一类过氧化物酶(GenBank ID: *MCHK_RS19040*, 甲硫氨酸残基含量 3.60%)中的甲硫氨酸残基含量显著高于其他几个抗氧化酶, 但是并不和甲硫氨酸亚砷还原酶有互作(表 2 和图 6)。6 个转录调控因子中的甲硫氨酸残基含量越高的并没有和甲硫氨酸亚砷还原酶相互作用越强(表 3 和图 7)。这说明并不是甲硫氨酸含量越高, 越和甲硫氨酸亚砷还原酶相互作用, 也不是含量越高互作就越强。*M. huakuii* 7653R 中含有 2 个 A 型甲硫氨酸亚砷还原酶(*MsrA1* 和 *MsrA2*)与 2 个 B 型甲硫氨酸亚砷还原酶(*MsrB1* 和 *MsrB2*), 它们的互作底物蛋白并不是都同时和这 4 个甲硫氨酸亚砷还原酶相互作用而是 1-4 个不等, 但是与 4 个 Msrs 都互作的蛋白最多(图 2B)。有些底物蛋白只和其中一个 *MsrA* 或 *MsrB* 互作, 而与另一个不互作(图 6 和图 7), 这可能和底物蛋白中甲硫氨酸亚砷残基位点的结构有关。

活性氧在结瘤和固氮过程中起重要作用, 过氧化氢有利于侵染线正常延伸^[1]。结果表明 *M. huakuii* 7653R 中 1 个过氧化物酶(GenBank ID: *MCHK_RS31355*)和 1 个过氧化氢酶(GenBank ID: *MCHK_RS16105*)都和 Msrs 有不同程度的相互作用(图 6)。超氧化物酶和过氧化物酶的缺失或者超表达都会影响到共生固氮的表型。苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)中超表达 *katB* 减少侵染线内部过氧化氢的含量, 结果导致结瘤延迟和畸形的侵染线^[26]。*Mesorhizobium loti* 中 *sodaA* 突变后在百脉根上表现结瘤缺陷, *katE* 突变后固氮酶活性下降了 50%^[1,27]。在 *S. meliloti* 中 *katA/katC* 双基因突变后固氮酶活显著下降并且早衰^[5]。这表明在 *M. huakuii* 7653R 中, 甲硫氨

酸亚砷还原酶能通过和抗氧化酶互作来影响共生固氮的过程。

扩增出的 5 个转录因子和 4 个 Msrs 都有不同程度的相互作用(图 7)。其中 RNA 聚合酶因子(GenBank ID: *MCHK_RS27745*, *MCHK_RS24415*)的甲硫氨酸含量都比另外 3 个高, 但是与 4 个 Msrs 的相互作用并不比其他强。大肠杆菌中的 *MsrA/B* 能修饰氧化的重组酶 *RecA*, 在 DNA 修饰中发挥功能^[28], 因此 *M. huakuii* 7653R 中的 Msrs 可能通过和 RNA 聚合酶因子的互作来调节转录过程, 但这需要更进一步地证明。*AraC* 家族转录因子主要和细菌毒力、生物被膜形成、耐药性和新陈代谢相关^[29-30], 在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中, *AraC* 家族转录因子可以直接调控毒力基因 *ctxAB* 和 *tcpA* 的转录^[31]。*Lrp/AsnC* 家族转录调控因子既能正调控氨基酸生物合成、菌毛生物合成和氨同化的操纵子, 也可以负调控参与氨基酸分解代谢和肽转运^[32]。*GNAT* 家族 N-乙酰转移酶, 参与调控细胞内代谢过程和信号通路。在 *S. meliloti* 中转录因子 *LsrB* 能和 *MsrA/B* 相互作用, 并能通过激活基因 *lrp3-lpsCDE* 的表达来调节脂多糖的合成, 也可以直接激活合成谷胱甘肽所需基因 *gshA* 表达, 同时控制氧化还原感受器 *OxyR* 的表达, *OxyR* 又可以调节 *katA* 的表达, 但是 *OxyR* 对共生固氮不是必需的^[23-34]。在大肠杆菌中 *MsrA* 能和信号识别颗粒蛋白 *Ffh* 相互作用, *Ffh* 中的甲硫氨酸氧化后不能与 4.5S RNA 相互作用^[16]。*M. huakuii* 7653R 中的 Msrs 可能通过与 *AraC* 家族转录因子、*Lrp/AsnC* 家族转录调控因子和 *GNAT* 家族 N-乙酰转移酶互作调控下游的生命活动。

本研究通过蛋白互作网站预测得到 *M. huakuii* 7653R 中 4 个甲硫氨酸亚砷还原酶的互作底物, 并对底物蛋白进行功能注释 GO 分析, 筛选出 2 个

抗氧化酶和 5 个转录调控因子与 4 个 Msrs 相互作用。为阐明 Msrs 抵抗氧化压力的作用机制提供了方向, 但它们之间具体的相互作用的机制需要进一步研究。

参考文献

- [1] SAEKI K. Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(8): 1327-1339.
- [2] SINGH R, SINGH S, PARIHAR P, MISHRA RK, TRIPATHI DK, SINGH VP, CHAUHAN DK, PRASAD SM. Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1299.
- [3] MØLLER IM, SWEETLOVE LJ. ROS signalling-specificity is required[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(7): 370-374.
- [4] EZRATY B, AUSSEL L, BARRAS F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005, 1703(2): 221-229.
- [5] SANTOS R, HEROUART D, PUPPO A, TOUATI D. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium-legume* symbiosis[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(4): 750-759.
- [6] ARDISSONE S, FRENDO P, LAURENTI E, JANTSCHKO W, OBINGER C, PUPPO A, FERRARI RP. Purification and physical-chemical characterization of the three hydroperoxidases from the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(39): 12692-12699.
- [7] DRAZIC A, MIURA H, PESCHEK J, LE Y, BACH NC, KRIEHLBER T, WINTER J. Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(23): 9493-9498.
- [8] SANTOS R, HÉROUART D, SIGAUD S, TOUATI D, PUPPO A. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(1): 86-89.
- [9] ROMSANG A, ATICHARTPONGKUL S, TRINACHARTVANIT W, VATTANAVIBOON P, MONGKOLSUK S. Gene expression and physiological role of *Pseudomonas aeruginosa* methionine sulfoxide reductases during oxidative stress[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(15): 3299-3308.
- [10] BELOIN C, VALLE J, LATOUR-LAMBERT P, FAURE P, KZREMINSKI M, BALESTRINO D, HAAGENSEN JAJ, MOLIN S, PRENSIER G, ARBEILLE B, GHIGO JM. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 51(3): 659-674.
- [11] KUBONIWA M, TRIBBLE GD, JAMES CE, KILIC AO, TAO L, HERZBERG MC, SHIZUKUISHI S, LAMONT RJ. *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(1): 121-139.
- [12] HOWELL K. Enhancing research and scholarly experiences based on students' awareness and perception of the research-teaching nexus: a student-centred approach[J]. *PLoS One*, 2021, 16(9): e0257799.
- [13] HERZBERG MC, NOBBS A, TAO L, KILIC A, BECKMAN E, KHAMMANIVONG A, ZHANG YS. *Oral streptococci* and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation-associated protein gene and mechanisms of *Streptococcus sanguis*-induced thrombosis[J]. *Journal of Periodontology*, 2005, 76(11 Suppl): 2101-2105.
- [14] DOUGLAS T, DANIEL DS, PARIDA BK, JAGANNATH C, DHANDAYUTHAPANI S. Methionine sulfoxide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3590-3598.
- [15] GUSTAVSSON N, KOKKE BP, HÄRNDAHL U, SILOW M, BECHTOLD U, POGHOSYAN Z, MURPHY D, BOELEN WC, SUNDBY C. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein[J]. *The Plant Journal*, 2002, 29(5): 545-553.
- [16] EZRATY B, GRIMAUD R, EL HASSOUNI M, MOINIER D, BARRAS F. Methionine sulfoxide reductases protect Ffh from oxidative damages in *Escherichia coli*[J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23(8): 1868-1877.

- [17] TARRAGO L, KIEFFER-JAQUINOD S, LAMANT T, MARCELLIN M, GARIN J, ROUHIER N, REY P. Affinity chromatography: a valuable strategy to isolate substrates of methionine sulfoxide reductases?[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 16(1): 79-84.
- [18] KIM JS, PARK HM, CHAE S, LEE TH, HWANG DJ, OH SD, PARK JS, SONG DG, PAN CH, CHOI D, KIM YH, NAHM BH, KIM YK. A pepper *MSRB2* gene confers drought tolerance in rice through the protection of chloroplast-targeted genes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90588.
- [19] CHEN WX, LI GS, QI YL, WANG ET, YUAN HL, LI JL. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41(2): 275-280.
- [20] ZHOU DL, LI YN, WANG XT, XIE FL, CHEN DS, MA BG, LI YG. *Mesorhizobium huakuii* HtpG interaction with nsLTP AsE246 is required for symbiotic nitrogen fixation[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(1): 509-528.
- [21] HARRIS MA, CLARK J, IRELAND A, LOMAX J, ASHBURNER M, FOULGER R, EILBECK K, LEWIS S, MARSHALL B, MUNGALL C, RICHTER J, RUBIN GM, BLAKE JA, BULT C, DOLAN M, DRABKIN H, EPPIG JT, HILL DP, NI L, RINGWALD M, et al. The gene ontology (GO) database and informatics resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(database issue): D258-D261.
- [22] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [23] JAMET A, KISS E, BATUT J, PUPPO A, HÉROUART D. The *kata* catalase gene is regulated by OxyR in both free-living and symbiotic *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(1): 376-381.
- [24] LEVINE RL, MOSONI L, BERLETT BS, STADTMAN ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(26): 15036-15040.
- [25] LEVINE RL, BERLETT BS, MOSKOVITZ J, MOSONI L, STADTMAN ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1999, 107(3): 323-332.
- [26] JAMET A, MANDON K, PUPPO A, HÉROUART D. H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8741-8745.
- [27] HANYU M, FUJIMOTO H, TEJIMA K, SAEKI K. Functional differences of two distinct catalases in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 under free-living and symbiotic conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(5): 1463-1471.
- [28] HENRY C, LOISEAU L, VERGNES A, VERTOMMEN D, MÉRIDA-FLORIANO A, CHITTENI-PATTU S, WOOD EA, CASADESÚS J, COX MM, BARRAS F, EZRATY B. Redox controls RecA protein activity via reversible oxidation of its methionine residues[J]. *eLife*, 2021, 10: 63747.
- [29] TOBES R, RAMOS JL. AraC-XylS database: a family of positive transcriptional regulators in bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 318-321.
- [30] FROTA CC, PAPA VINASASUNDARAM KG, DAVIS EO, COLSTON MJ. The AraC family transcriptional regulator Rv1931c plays a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(9): 5483-5486.
- [31] KRUKONIS ES, YU RR, DiRITA VJ. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(1): 67-84.
- [32] ZIEGLER CA, FREDDOLINO PL. The leucine-responsive regulatory proteins/feast-famine regulatory proteins: an ancient and complex class of transcriptional regulators in bacteria and archaea[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2021: 1-28.
- [33] TANG GR, WANG Y, LUO L. Transcriptional regulator LsrB of *Sinorhizobium meliloti* positively regulates the expression of genes involved in lipopolysaccharide biosynthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(17): 5265-5273.
- [34] LU DW, TANG GR, WANG D, LUO L. The *Sinorhizobium meliloti* LysR family transcriptional factor LsrB is involved in regulation of glutathione biosynthesis[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2013, 45(10): 882-888.