

毛萼田菁茎瘤菌被种子浸提物诱导表达基因的筛选及其功能

蔡文通, 蔡韬, 张江, 郑会明, 钟增涛*, 朱军

(南京农业大学生命科学院, 南京 210095)

摘要 【目的】选择毛萼田菁茎瘤菌 ORS571 为研究对象, 筛选毛萼田菁茎瘤菌在菌植互作早期被宿主植物种子浸提物诱导表达的基因。【方法】采用新颖的基于抗性的活体表达筛选技术, 以种子浸提物为诱导物, 筛选获得能够稳定被种子浸提物诱导的突变株。通过中间片断融合报告基因的方法研究信号分子对相关基因的诱导情况。【结果】随机引物 PCR 产物测序及网上 BLAST 结果表明, 被诱导表达的基因为 *LysE* 家族的成员。而且, 对另外 3 个属根瘤菌中 *lysE* 基因的研究发现, 它们都可以被相应的宿主植物种子浸提物诱导表达。此外, 这四株根瘤菌的 *lysE* 突变株都表现对刀豆氨酸极为敏感。本文首次报道了 *lysE* 家族在根瘤菌中的生理功能。【结论】我们推测, *LysE* 家族蛋白可能广泛存在于根瘤菌中, 并在根瘤菌与宿主植物的早期相互作用中发挥重要作用。

关键词: 毛萼田菁茎瘤菌; *LysE* 家族; 刀豆氨酸; 种子浸提物

中图分类号: Q786 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)09-1171-05

毛萼田菁 (*Sesbania rostrata*) 与毛萼田菁茎瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans* ORS571) 建立的共生体系, 可同时形成根瘤和茎瘤。茎瘤与根瘤相比具有许多优越性, 如固氮酶活性高, 固氮量大, 化合态氮耐受性高等。而且, 茎瘤的形成不受植物根毛的限制和土著根瘤菌竞争的影响^[1]。由于毛萼田菁与毛萼田菁茎瘤菌建立的共生体系的固氮能力较只产生根瘤的固氮体系要高很多, 所以毛萼田菁被广泛的在热带地区作为绿肥使用。因此, 研究毛萼田菁茎瘤菌具有重要的应用意义。

豆科植物与根瘤菌的共生识别是一种双向的信号物质交换过程。早期是豆科植物的根或种子分泌类黄酮物质, 诱导根瘤菌的结瘤基因表达, 产生结瘤因子, 分泌到胞外后被植物所识别, 从而引发植物某些特异性的基因表达, 最终导致根毛卷曲等一系列变化。

已有报道表明, 种子浸提物和根系分泌物都能

诱导根瘤菌某些早期结瘤基因的表达。其中, 研究最广泛的是具有趋化诱导作用的黄酮类物质。作为植物的共生信号, 黄酮类物质与根瘤菌的结瘤调节基因 *nodD* 的产物一起发挥作用, 诱导结瘤基因 *nodABC* 等的表达, 形成根瘤菌结瘤因子-寡脂多糖, 结瘤因子分泌到菌体外并作用于根尖, 最终诱导根瘤的形成^[2]。本文以种子浸提物作为诱导物, 采用新颖的基于抗性的活体表达筛选, 筛选到可被诱导的 *asiE* 基因, 同源比对发现, *asiE* 是 *LysE* 家族的一员。研究表明该基因对根瘤菌与宿主的早期识别具有重要意义。由于 *LysE* 家族在根瘤菌及茎瘤菌中报道的很少, 所以 *asiE* 可以为我们了解豆科植物与根瘤菌的共生识别提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 本试验所用菌株和质粒见表 1。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30870065, 30800013)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84396645; E-mail: ztzhong@njau.edu.cn

作者简介: 蔡文通(1984-)男, 内蒙古人, 硕士研究生, 从事分子微生物学研究。E-mail: caiwentong@163.com

收稿日期: 2009-02-23; 修回日期: 2009-05-09

表 1 本研究中所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Characteristics	Reference or Source
Bacteria strains		
Azc0	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571, Wild type, Ap ^r	This laboratory ^[3]
Azc1	Derivative of Azc0, <i>asiE</i> : <i>lacZ</i> , <i>asiE</i> disrupted, Km ^r	This study
Azc2	Derivative of Azc0 carrying Tn inserted <i>asiE</i>	This study
YW0	Derivative of <i>Sinorhizobium</i> sp. 1128, Spontaneous Sm ^r	This laboratory ^[4]
ZHJ1	Derivative of YW0, <i>ssiE</i> : <i>lacZ</i> , <i>ssiE</i> disrupted, Km ^r	This study
HMZ0	Derivative of <i>Mesorhizobium tianshanense</i> CCB306, Spontaneous Sm ^r	This laboratory ^[5]
TC1	Derivative of HMZ0, <i>msiA</i> : <i>lacZ</i> , <i>msiA</i> disrupted, Km ^r	This study
Rhizobium etli		
CE3	Derivative of <i>Rhizobium etli</i> CFN42, Spontaneous Sm ^r	This laboratory ^[6]
Rhe1	Derivative of <i>Rhizobium etli</i> CE3, <i>rsiE</i> : <i>lacZ</i> , <i>rsiE</i> disrupted, Km ^r	This study
Escherichia coli		
SM10λpir	Conjugal donor strain, Sm ^r host of pJZ260	This laboratory
DH5α	Standard cloning host	This laboratory
BW20676	Conjugal donor strain, host of pVIK112	This laboratory
Plasmids		
pJZ260	R6K vector with a mariner transposon (Cm ^r , promoterless Km resistance gene), Ap ^r	This laboratory
pVIK112	Transcriptional fusion vector, R6K Origin, Km ^r	This laboratory
pAzc1	pVIK112 derivative carrying internal fragment of <i>asiE</i> , Km ^r	This study

1.1.2 培养基和培养条件:毛萼田菁茎瘤菌及相关突变株采用 YL 培养基,在 37℃ 下培养。其它根瘤菌及相关突变株采用 TY 培养基,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:链霉素(Sm)为 100 μg/mL,卡那霉素(Km)为 50 μg/mL,*E. coli* SM10λpir(pJZ260)所用氨苄青霉素(Ap)为 100 μg/mL,氯霉素(Cm)为 20 μg/mL。

1.1.3 试剂与仪器:各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司或 Fermentas 公司;ONPC(邻硝基苯-β-D-半乳糖吡喃糖苷, *o*-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside), IPTG(异丙基-β-硫代半乳糖苷, isopropyl-β-D-thiogalactoside),X-Gal, Canavanine(刀豆氨酸, CAN)购于 Sigma 公司;Taq DNA 聚合酶和 T₄DNA 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 测序均由深圳华大基因研究院完成。

1.2 种子浸提物(SE)的制备

取 40 g 毛萼田菁种子,先用无菌水洗干净。再用 70% 酒精进行表面消毒。消毒处理后,用无菌水清洗两次,最后加入 100 mL 无菌水 28℃ 浸泡两天。收集浸泡液,加无菌水至 100 mL,过滤除菌,于 -20℃ 贮存。

1.3 接合转移建立突变子文库

受体 Azc0 和供体 *E. coli* SM10λpir(pJZ260) 进行两亲接合,参照文献 [7] 进行操作。

1.4 目的菌株的筛选

由于 mariner 转座子(见表 1, Plasmids)上含有没有启动子的卡那霉素抗性基因(Km^r),当它转座插入到某个启动子后面或基因的内部, Km^r 的表达就会受到该启动子的调控。将转座子突变文库中的插入突变株稀释适当的倍数后,涂布于含有 Sm100, Km40, SE 1%(V/V) 的 YL 平板上。长出的菌落,就是 Km^r 基因得到表达的突变株,即卡那霉素抗性基因插在组成型表达的基因内或者是被种子浸提物诱导表达的基因内。挑取这些菌落,分别点在 Km40 和 Km40, SE 1%(V/V) 的 YL 平板上。如果转座子文库中的突变株在两种固体培养基上都生长,说明为组成型表达的启动子;如果只在含根系浸提物的平板上生长,这说明卡那霉素抗性基因很有可能插在了被种子浸提物诱导表达的基因内,这些插入突变株即为候选的目的菌株。

1.5 Azc2 生长曲线的测定

按 1% 接种 Azc2 至两瓶含有 50 μg/mL 卡那霉素的 YL 液体培养基中,一瓶加入 1% 种子浸提物(SE),另一瓶加入等量的去离子水做对照, 37℃ 摇床培养。每隔 8 h 测定菌体浓度(OD₆₀₀),绘制生长曲线。

1.6 任意 PCR(Arbitrary PCR)对目的基因的扩增及序列分析

按照文献 [4] 进行操作。序列如下:137-1 5'-C-

AGGGACACCAGGATTTAT-3';137-2:5'-CTTCCGTC-ACAGGTAGCG-3'。Arbitrary PCR 第二轮产物分别以 137-2, Km-2 为相应的测序引物,提交至深圳华大基因研究院进行 DNA 测序,测序结果采用 CloneManager Professional Suite 软件进行 DNA sequence 比对,拼接两端序列并在 NCBI 数据库中 BLAST 的 translated query vs. protein database(Blastx) 分析。

1.7 *asiE ssiE msiA rsiE-lacZ* 转录融合表达菌株的构建

以 *asiE* 为例,在已获得的 *asiE* 基因中间选取一段 450 bp 左右的片段,根据此片段设计一对引物,上游引物带有 *EcoR* I 酶切位点,下游引物带有 *Xba* I 酶切位点。PCR 扩增出目的片段,然后与载体 pVIK112 分别经双酶切后,经电泳检测,胶纯化回收目的片段,酶连,电转化入 *E. coli* BW20676 中,再通过酶切验证以得到阳性克隆,命名为 pAzc1。将该菌株和 Azc0 进行双亲接合。由于 pVIK112 是自杀性质粒载体,其通过接合进入 Azc0 后,无法复制,但是质粒 pAzc1 上的 *asiE* 片段可以与 Azc0 基因组上 *asiE* 发生同源重组,进而将 pAzc1 整合在染色体上。得到目的接合子,液体 YL 培养基培养后抽提总 DNA,以 *asiE* 表达引物和 LacZ-out 为上下游引物,验证 pAzc1 在 Azc0 中是否发生同源重组,得到的重组子命名为 Azc1。

1.8 β -半乳糖苷酶活性的测定

按照文献 [8] 进行操作。

1.9 CAN 敏感性试验

按照文献 [9] 进行操作。

2 结果

2.1 目的突变株的获得及验证

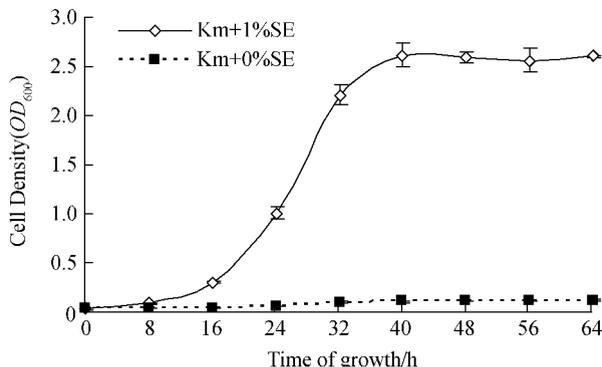


图1 *AsiE* 插入失活突变株 Azc2 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *asiE* insertion mutant with seed exudates(SE).

通过上述平板筛选的方法,从 5500 个突变株中筛选获得了一株可以被稳定诱导的突变株,即在平板上表现出极大的生长差异。为了验证所得结果,测定了突变株 Azc2 的生长曲线。由图 1 可知,当没有种子浸提物存在的情况下,Azc2 在 Km 的作用下被杀死,生长受到抑制,在 64 小时内 OD600 值几乎没有变化。而当种子浸提物存在,Azc2 表现出正常的生长规律,这是因为种子浸提物诱导了转座子上游启动子的表达,因此 Km^r 被诱导表达,表现为对 Km 不敏感。

2.2 mariner 转座子插入位点侧翼序列分析

以 Azc2 的基因组 DNA 为模板,分别以 mariner 转座子 5'端和 3'端的引物进行任意 PCR 扩增分别得到 mariner 转座子的 5'和 3'端的序列各 800 bp 左右,以 Azc0 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 转座子插入在 *Azorhizobium caulinodans* ORS571 的 L-赖氨酸输出蛋白基因(命名为 *asiE*)131 bp 和 132 bp 之间。该基因(GenBank 登录号 FJ612449)由 606 个核苷酸组成,与 HMZO 的 *msiA* 基因有 56% 的同源性。

2.3 *asiE* 及其他相似基因的诱导表达分析

本实验室已有的实验结果表明(未发表数据)甘草种子浸提物中含有的 CAN 能够诱导天山根瘤菌 CCBAU3306 中 *msiA* 的表达,*msiA* 突变株表现为对 CAN 敏感。*AsiE* 和 *MsiA* 氨基酸序列有 56% 的同源性。用 *asiE* 的序列在 NCBI 上 BlastX 结果显示,很多根瘤菌的基因组中都有 *asiE* 的同源基因,包括 *Sinorhizobium sp.* 1128 中的 *ssiE* 和 *Rhizobium etli* CE3 中的 *rsiE*,与 *asiE* 同源性分别为 55% 和 54%。本实验选取了实验室保存的根瘤菌菌株并结合 NCBI 数据库上已有的序列信息,对 *asiE* 同源基因都构建了 *lacZ* 中间片断转录融合表达体系,检测这些基因的诱导表达情况。结果发现,*asiE* 只能被 CAN 诱导表

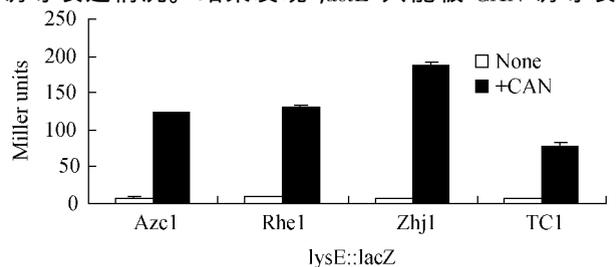


图2 不同根瘤菌菌株中 *lysE* 基因受刀豆氨酸诱导表达的情况

Fig.2 *lysE* expression induced by CAN in different Rhizobia species.

达,而三种碱性氨基酸和其他已报道过的可以诱导 *lysE* 基因表达的氨基酸^[10]都不能诱导 *asiE* 表达 (Supporting information)。而且, *asiE* 在四种根瘤菌中的同源基因都可以不同程度地被 CAN 诱导表达。由图 2 可知,该类基因的本底表达量很低,而在 Zhj1 中的诱导能力高达约 25 倍。

2.4 *asiE* 及其同源基因的突变株对刀豆氨酸的敏感性分析

对于不同属的根瘤菌,用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 刀豆氨酸同时处理野生型和突变株后,进行梯度稀释,计算单菌落数量。结果(图 3)发现,刀豆氨酸处理野生型菌株,几乎没有造成菌数量的减少;而同样的条件作用于突变株,细菌数量显著降低,未处理的细胞数量约为处理后的 100~1000 倍。

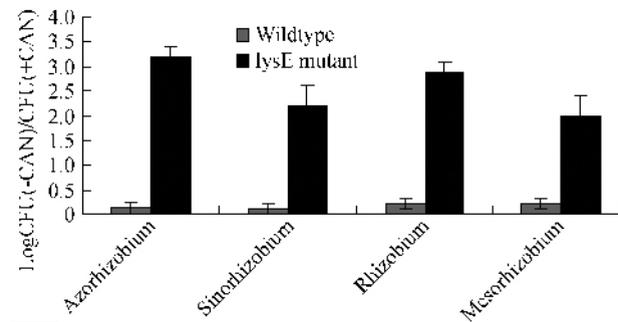


图 3 *asiE* 及其在不同根瘤菌中同源基因的突变株对刀豆氨酸的敏感性

Fig. 3 Sensitivity to canavanine of *asiE* mutant and similar mutants in other Rhizobia species.

3 讨论

本文采用新颖的基于抗生素的活体表达筛选技术,在毛萼田菁茎瘤菌中筛选获得一个可被种子浸提物诱导表达的基因 *asiE*,BLAST 比对后发现其属于 *LysE* 家族。利用 PredictProtein 对 *AsiE* 进行结构预测发现此蛋白具有六个疏水区,但只有五个螺旋跨膜区域,这些区域是很多膜上运输蛋白具有的典型结构域。此结果与 Vrljic 等通过基因融合表达得到的结果一致^[10]。进一步分析证明,种子浸提物中的刀豆氨酸可以诱导 *asiE* 的表达。对实验室已有菌株 *lysE* 家族基因的表达分析发现,它们都可以在不同程度上被刀豆氨酸诱导表达,而且, *asiE* 缺失突变株 *Azc1* 对刀豆氨酸很敏感,而野生型 *Azc0* 的生长却不受刀豆氨酸影响。

Bell 等(1978)报道, L-刀豆氨酸普遍存在于豆科的 240 属, 1200 种植物中。由于 L-刀豆氨酸结构与

L-精氨酸的结构类似,精氨酰-tRNA 合成酶会将刀豆氨酸误认为精氨酸,在蛋白质的合成过程中添加到多肽链中,含刀豆氨酸的肽链不能正确的折叠从而导致蛋白质变性,导致细胞在形态和生长上出现异常^[11]。

LysE 家族氨基酸运输蛋白最早在谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中被发现,其功能是将胞内过量的赖氨酸运出到胞外^[12],后来在其它细菌中也有发现。Nandineni 等报道,大肠杆菌中 *YggA* 与谷氨酸棒状杆菌的 *LysE* 具有很高的相似性,而且 *YggA* 可以将胞内的精氨酸和刀豆氨酸运输到胞外, *YggA* 突变株表现出对刀豆氨酸敏感^[9]。而 *asiE* 与谷氨酸棒状杆菌的 *lysE* 具有 70% 的同源性,所以我们推测,毛萼田菁茎瘤菌中存在 *asiE* 可以将 L-刀豆氨酸运输到胞外,消除其对细胞的毒性作用。在许多豆科植物中,其种子萌发时可以分泌大量的刀豆氨酸,作为防御因子控制根际土壤中微生物的种类和数量,EMMERT 等实验表明蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 刀豆氨酸抗性突变株 UW2000 和野生型 UW85 相比,可以更好的在苜蓿种子周围生长^[13]。

刀豆氨酸作为一种植物的防御因子,可以抑制某些根际细菌的生长。由于毛萼田菁茎瘤菌中存在 *asiE*,可以将 L-刀豆氨酸运输到胞外,消除其毒性作用。本实验中检测到在不同属的根瘤菌中 *lysE* 都可以被刀豆氨酸诱导,同时 *LysE* 家族蛋白在根瘤菌中普遍存在,可以推测这类蛋白能使根瘤菌更好的适应豆科植物种子周围较高浓度的刀豆氨酸,从而为根瘤菌与宿主植物的早期相互作用提供良好的基础,这也许是根瘤菌与宿主植物在长期的进化过程中相互选择适应的结果,本研究结果为根瘤菌与宿主植物之间的协同进化提供了理论依据和新的思路。

参考文献

- [1] Olsson JE. Stem and root nodulation of tropical legumes *Sesbania rostrata* by Rhizobium strains ORS571 and WE7. *Plant Physiology*, 1985, 121: 199 - 210.
- [2] 杨国平,朱军,姜无忌. 紫云英根瘤菌结瘤因子的初步研究. 微生物学报(Acta Microbiologica Sinica), 1994, 34(5): 406 - 408.
- [3] Dreyfus B, Davis L, Jones D, et al. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. Nov. a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systemic Bacteriology*, 1988, 38: 89 - 98.

- [4] 汪洋,郑会明,杨梦华,等. 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. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) 2007 47(5) 838 - 842.
- [5] Zheng HM, Zhong ZT, Lai X, et al. A LuxR/LuxI-Type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. *Journal of Bacteriology*, 188(5):1943 - 1949.
- [6] Noel KD, Sanchez A, Fernandez L, et al. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *Journal of Bacteriology*, 1984, 158: 148 - 155.
- [7] Chiang SL, Mekalanos JJ. Construction of *vibrio cholerae* vaccine candidate using transposon delivery and FLP recombinase-mediated excision. *Infection and Immunity*, 2000, 68(11) 6391 - 6397.
- [8] Miller JH. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [9] Nandineni MR, Gowrishankar J. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the lysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11) 3539 - 3546.
- [10] Vrljic M, Garg J, Lee W, et al. The lysE superfamily: Topology of the Lysine exporter lysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1999, 1(2) 327 - 336.
- [11] Bell EA, Laky JA, Dohil RM. Systematic significance of canavanine in papilionoideae (Fabioidea). *Biochemical Systemic Ecology*, 1978, 6: 193 - 204.
- [12] Broer S, Kramer R. Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 202: 137 - 143.
- [13] Emmert EA, Jocelyn M, Julie CL, et al. Effect of canavanine from alfalfa seeds on the population biology of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12) 4683 - 4688.

Identification and functional characterization of genes induced by seed exudates in *Azorhizobium caulinodans* ORS571

Wentong Cai, Tao Cai, Jiang Zhang, Huiming Zheng, Zengtao Zhong*, Jun Zhu

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract [**Objective**] To identify genes induced by plant seed exudates in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. [**Methods**] Using promoterless kanamycin resistance gene (Km^r) on transposon as reporter gene and seed exudates as inducers, we screened genes of interest from transposon insertion mutants libraries. We streaked mutants on TY solid medium with Km^r and another with Km and seed exudates correspondingly. If Km^r is inserted into a gene that can be induced by plant signals, Km^r will possibly express at the same time. Thus, mutants were selected that can grow on medium with Km and exudates, rather than on medium with Km. [**Results**] We identified a *lysE* family gene named *asiE* in strain Azc0 that can be induced by seed exudates and further analysis indicated that the inducing substance is canavanine (CAN). *lacZ* transcriptional fusion of *asiE* confirmed that its expression increased by ten-fold or so under the induction of CAN. Besides, *lysE* gene in four different species of Rhizobia can be induced by CAN. *lysE* mutants are all sensitive to CAN treatment whereas wild type are resistant. [**Conclusion**] The existence of LysE can make rhizobia better survived in the rhizosphere and may play an important role in early stage of interaction between rhizobia and host plant.

Keywords : *Azorhizobium caulinodans* ORS571 ; LysE family ; Canavanine ; seed exudates

(本文责编:王晋芳)