

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(11): 1465 - 1469; 4 November 2009
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

华癸中生根瘤菌质粒复制基因 *repC* 的克隆与鉴定

胡国元¹, 王善明², 李伟伟¹, 李友国²

(¹ 武汉工程大学绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 武汉 430073)

(² 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要:【目的】*repC* 为质粒复制必需的起始蛋白基因。本研究旨在对华癸中生根瘤菌菌株 HN3015 及其质粒消除突变株进行 *repC* 基因的克隆和鉴定。【方法】采用通用引物 RC1 和 RC3 进行 *repC* 基因的 PCR 扩增, 扩增产物克隆到载体 pMD-18T, 然后测序。利用 Southern 杂交对 *repC* 基因定位。利用在线软件分析基因的序列特征, BLAST 工具进行同源性搜索; ExPASy 推断其氨基酸的序列; ClustalW 进行同源核苷酸和氨基酸序列的多重比较分析; PredictProtein 进行蛋白二级结构分析。【结果】供试菌株均扩出了 750 bp 左右的 *repC* 序列。Southern 杂交结果显示: *repC* 基因在每个供试菌株中只存在于一个质粒上。【结论】生物信息学分析结果表明: 供试华癸中生根瘤菌菌株的 *repC* 序列相似性高达 100%, 但与其它根瘤菌的 *repC* 基因有明显差异。本研究对深入阐明华癸中生根瘤菌质粒复制机制具有一定参考价值。

关键词: 华癸中生根瘤菌; *repC*; PCR 扩增; 鉴定

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1465-05

多数根瘤菌质粒属于质粒复制基因 *repABC* 家族。RepC 为质粒复制必需的起始蛋白, RepA 和 RepB 参与质粒的分配并调节其拷贝数^[1]。质粒复制基因 *repC* 的扩增与序列测定已有许多研究报告^[2-7]。不同的复制基因群代表不同的不相容性群, 当一个菌株存在两个或更多的 *repC* 基因时, 它们通常与不同的质粒相关^[2-3]。用 RC1/RC3 引物对可在 1209 - 1332 bp 长的 *repC* 基因中扩增出约 750 bp 的片段, PCR 和 DNA 杂交研究已定义了 4 个明显不同的质粒相关 *repC* 基因群 (*repC1* - 4), 4 个 *repC* 群间是相容的, 但群内不相容^[2-3]。另一个 *repC* 复制基因的远缘家族 *repC*-TypeA 亦在 *Rhizobiaceae* 和 *Paracoccus versytus* 中鉴定出^[8-9]。多个不相容群对于维持多组分基因组的稳定是必需的, 且在 alpha-Proteobacteria 中占优势^[10]。Rigottier-Gois 等^[3] 报道当将一个 Tn5 标记并具有群 IV *repC*

基因的质粒导入已证实属于群 IV 系列的受体菌中将表现为互不相容, 但可与其它群 *repC* 相容。Palmer 等^[4] 从 *Rhizobium leguminosarum* 群体中鉴定出 *repC5*、*repC6* 和 *repC7* 等 3 个新的 *repC* 系列。通用引物修改后可用于从 *Sinorhizobium* 和 *Mesorhizobium* 属的菌株中进行更大范围的 *repC* 基因扩增。他们还指出以前报道的 *repC* 基因群特异引物不能扩增 *repC3* 基因群, 并发展出一个新的 *repC3* 扩增策略。Miao 等^[5] 采用 RC1/RC3 引物从两个不相容的质粒 pSfrHN01a 和 pSfrYc4b 中检测到 *repC* 基因的存在。有关 *repABC* 质粒家族的已有知识显示 *repABC* 操纵子基因结构的多样性和遗传调节的复杂性。如果要了解 *repABC* 控制质粒的复制与分配机制, 必需对与这些功能相关的染色体元素和这些大分子之间相互作用的数量与本质进行鉴定^[11-12]。

华癸中生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 是我国

基金项目: 湖北省自然科学基金(2007ABA316); 湖北省教育厅科学技术研究计划(D20081509)

作者简介: 胡国元(1965 -), 男, 湖北红安人, 博士, 教授, 主要从事分子微生物学研究。Tel: + 86-27-87194708; Fax: + 86-27-87195671; E-mail: hgy701@tom.com

收稿日期: 2009-07-06; 修回日期: 2009-08-23

长期研究根瘤菌的模式菌株,目前国内外对华葵中生根瘤菌的研究主要集中于共生相关基因的克隆、鉴定、遗传多样性和内源质粒的相互作用及其共生固氮效应的研究,对华葵中生根瘤菌内源质粒的复制及其质粒的不相容性形成的分子机制的研究较少^[13]。本研究利用通用引物 RC1 和 RC3 对华葵中生根瘤菌(*M. huakuii*)菌株 HN3015 及其质粒消除突变株进行了 *repC* 的 PCR 扩增、克隆与测序。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件: Hu 等^[14]已描述了 *M. huakuii* HN3015 (含有 pMhHN3015a, 150 kb; pMhHN3015b, 294 kb; pMhHN3015c, 390 kb)及其质粒消除突变株 HN3015-1 (含有 pMhHN3015a, pMhHN3015b)、HN3015-2 (含有 pMhHN3015a, pMhHN3015c)、HN3015-3 (含有 pMhHN3015b; pMhHN3015c)。供试菌株的培养条件参见文献[14]。本研究使用的抗生素氨苄青霉素(Amp)浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.2 主要试剂和仪器: pMD-18T 载体(TaKaRa, 大连); PCR 仪(Bio-Rad MyCycler, 美国)。

1.2 基因克隆与测序

扩增质粒复制基因 *repC* 的方法参见文献[15]。扩增产物克隆到载体 pMD-18T 上,然后测序。

1.3 质粒检测和分子杂交

质粒检测参考改进的 Eckhardt 方法^[16],分子杂交参考 Roche 地高辛标记试剂盒操作 DIG 系统的技术提示进行。

1.4 序列分析

DNA 序列及其编码的蛋白特性采用可获得的有关软件进行分析。应用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站中 BLAST 工具进行同源性搜索;应用 ExPASy (<http://www.expasy.org>) 进行核苷酸序列比较并推断其氨基酸的序列;应用 CLUSTALW 软件进行同源核苷酸和氨基酸序列的多重比较分析;应用在线蛋白质分析软件 PredictProtein 进行蛋白二级结构分析。

2 结果

2.1 *repC* 基因的 PCR 扩增

本研究利用特异引物 RC1 和 RC3 对 HN3015 及其质粒消除突变株 HN3015-1、HN3015-2、HN3015-3 进行了 *repC* 的 PCR 扩增。从 HN3015、HN3015-1、HN3015-2、HN3015-3 中均扩增出 750 bp 左右的 *repC*

基因片段(图 1)。类似结果亦在 *R. Leguminosarum*^[2]和 *S. fredii*^[5]中报道。

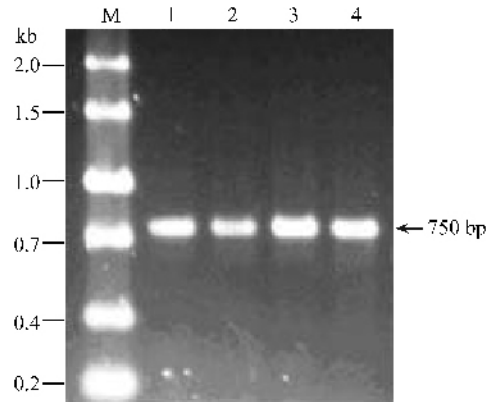


图 1 HN3015 及其质粒消除后代 *repC* 基因的扩增产物
Fig.1 PCR products of *repC* genes amplified of HN3015 and its derivatives of plasmid curing. M, Marker λ ; Lane 1, HN3015; Lane 2, HN3015-1; Lane 3, HN3015-2; Lane 4, HN3015-3.

2.2 分子杂交

采用供试菌株 HN3015 的 *repC* 基因作探针分别与 4 个供试菌株的质粒电泳凝胶进行 Southern 杂

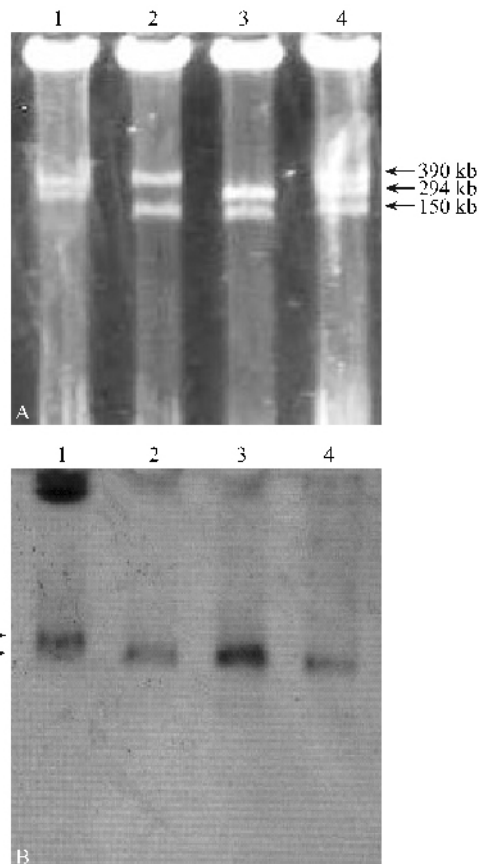


图 2 华葵中生根瘤菌 HN3015 及其质粒消除突变株 *repC* 基因的定位(A)质粒图谱;(B)Southern 杂交图谱
Fig.2 Location of the *repC* sequences on different plasmids in *M. huakuii* HN3015 and its derivatives of plasmid cured. (A) Plasmid profiles; (B) Southern hybridization with dig-*repC*. Lane 1, HN3015-3; Lane 2, HN3015-2; Lane 3, HN3015-1; Lane 4, HN3015.

交。图 2-A 和 B 分别是 4 个供试菌株的质粒电泳图和质粒电泳凝胶的分子杂交图。从图 2 可以看出: 每个供试菌株只有一条质粒的杂交带, 表明 *repC* 基因在每个供试菌株中只存在于一个质粒上。HN3015、HN3015-1、HN3015-2 的质粒 pMhHN3015a 上均有杂交信号, 而 HN3015-3 的杂交信号显示在质粒 pMhHN3015b 上。

2.3 *repC* 基因的序列测定与比较分析

本研究对 4 个供试菌株 (HN3015、HN3015-1、HN3015-2、HN3015-3) *repC* 基因的 PCR 扩增产物进行了回收、并亚克隆到测序载体 pMD18-T 之后, 转化 *E. coli* DH5 α , 在 LB + Amp 琼脂平板上筛选白色的菌落。再通过 PCR 扩增和凝胶电泳检验克隆子。

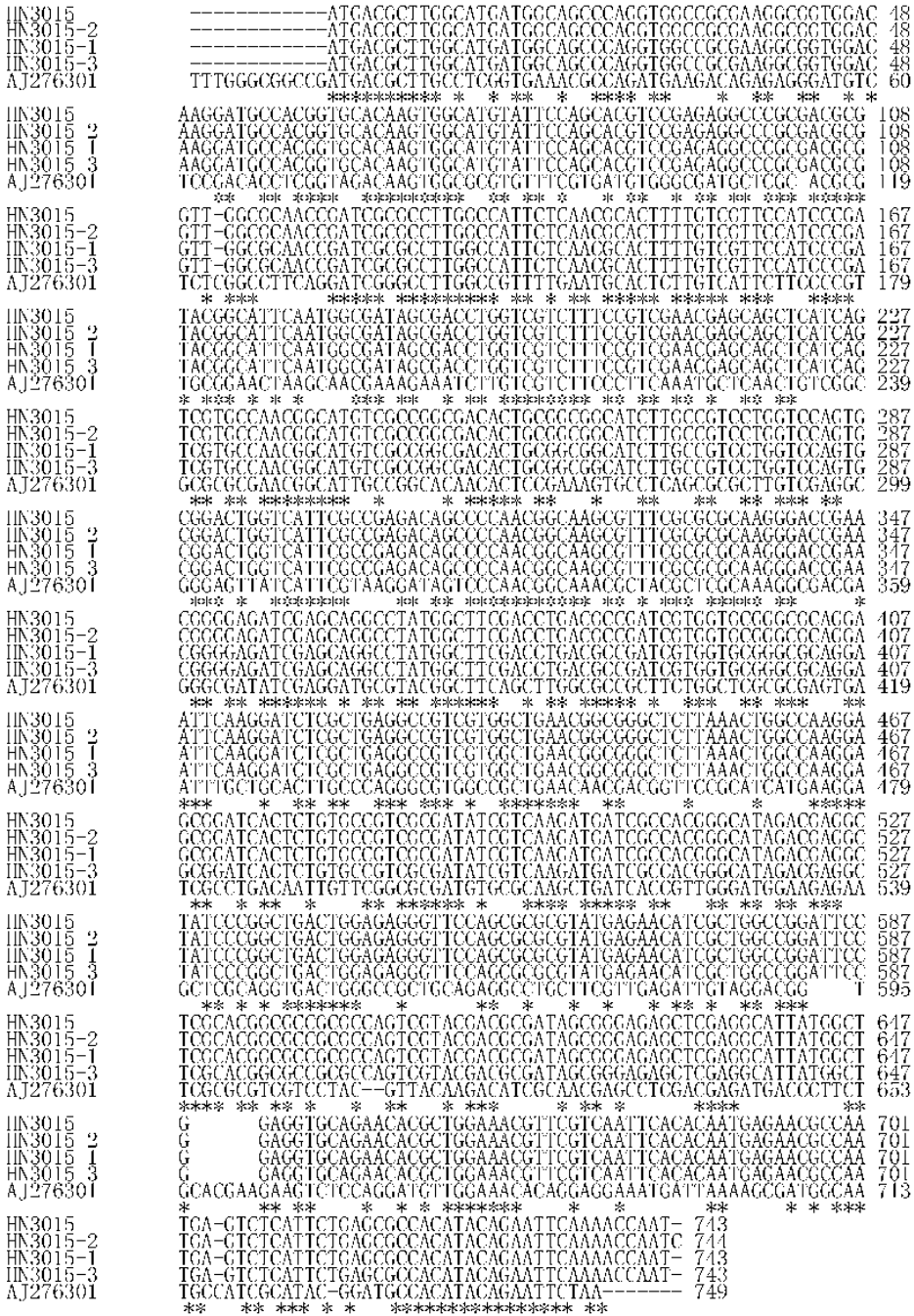


图 3 华癸中生根瘤菌 HN3015 及其质粒消除突变株与一个 *Rhizobium leguminosarum vicia* 菌株的 *repC* 基因碱基序列的同源性分析

Fig. 3 The alignment of *repC* gene sequence of *M. huakui* HN3015 and its plasmid cured derivatives and a *Rhizobium leguminosarum vicia* strain. * represent same base.

将经过验证的 4 个转化子交给北京奥科公司进行 *repC* 基因的测序。4 个供试菌株的 *repC* 基因的碱基序列用 ClustalW 软件进行的比较分析结果见图 3。由图 3 可以看出:本研究供试菌株 *repC* 基因的碱基序列高度相似。但与其它根瘤菌菌株的 *repC* 基因系列差异明显(表 1)。

表 1 HN3015 与其它根瘤菌 *repC* 基因的同源性比较

Table 1 Similarity comparison of *repC* gene sequences between HN3015 and other rhizobia in the database

GenBank Accession No.	Source	Identity/%
AJ245800	<i>Mesorhizobium tianshanense</i> strain USDA 3592	72
AJ245801	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i> strain USDA 3392	72
AJ245803	<i>Rhizobium tropici</i> strain USDA 9030	46
AJ276301	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> clone FIII 70.2	45
Z69866	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	42

3 讨论

本研究的 *repC* 序列分析结果表明供试菌株的 *repC* 序列高度相似。HN3015 (GenBank 登录号 DQ907935) 分别与消除第一大质粒的 HN3015-1、消除第二大质粒的 HN3015-2、消除第三大质粒的 HN3015-3 之间的 *repC* 序列相似性高达 100%。以上所有 *repC* 序列推定的氨基酸系列同一性均达到 100%。本结果表明供试 *M. huakuii* 菌株的 *repC* 序列具有高度相似性。但供试 4 个测序菌株的 *repC* 序列与 *R. leguminosarum viciae* 的 *repC* (GenBank 登录号 AJ276301) 的相似性仅为 45%，氨基酸系列相似性仅为 38%，说明种间的 *repC* 系列存在明显差异。利用在线蛋白质分析软件 PredictProtein 对 DQ907935 和 AJ276301 的 RepC 蛋白的二级结构进行预测分析结果如下:在 DQ907935 的 RepC 蛋白的二级结构中,螺旋结构占 57.03%，折叠结构占 4.94%，成环结构占 38.02%。在 AJ276301 的 RepC 蛋白的二级结构中,螺旋结构占 56.27%，折叠结构占 4.18%，成环结构占 39.54%。RepC 蛋白的二级结构分析结果显示 DQ907935 与 AJ276301 的 RepC 蛋白的二级结构组成高度相似,这与 RepC 的功能保守性一致。

HN3015 虽与 *R. Tropici*、*R. leguminosarum* 的 *repC* 序列差异明显、亲缘关系较远,但与 *M. tianshanense* 和 *M. mediterraneum* 的 *repC* 序列的同源性较高、亲源关系较近。根瘤菌种内 *repC* 系列的多

样性在 *R. leguminosarum*^[2-4] 和 *S. fredii*^[17] 中已有报道。由于本研究测序菌株有限,且包含部分突变菌株,为此难于全面反映 *M. huakuii* 种内的 *repC* 序列的分布情况,相关研究工作还需深入,通过更换 *repC* 序列的引物进行更广泛的 *repC* 序列的检测、对 *repA* 和 *repB* 基因的扩增以及对 *repC* 基因的定位有助于全面解释 *M. huakuii* 质粒复制的分子机制。

参考文献

- [1] Ramírez-Romero MA, Soberón N, Pérez-Oseguera A, et al. Structural elements required for replication and incompatibility of the *Rhizobium etli* symbiotic plasmid. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 3117–3124.
- [2] Turner SL, Rigottier-Gois L, Power RS, et al. Diversity of *repC* plasmid-replication sequences in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 1996, 142: 1705–1713.
- [3] Rigottier-Gois L, Turner SL, Yong JP, et al. Distribution of *repC* plasmid-replication sequence among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. *Microbiology*, 1998, 144: 771–780.
- [4] Palmer K M, Turner SL, Young JPW. Sequence diversity of the plasmid replication gene *repC* in the *Rhizobiaceae*. *Plasmid*, 2000, 44: 209–219.
- [5] Miao LH, Zhou K, Zhou JC, et al. Apparent incompatibility of plasmid pSfrYC4b of *Sinorhizobium fredii* with two different plasmids in another strain. *Arch Microbiology*, 2005, 83: 359–367.
- [6] Soberón N, Venkova-Canova T, Ramírez-Romero MA, et al. Incompatibility and the partitioning site of the *repABC* basic replicon of the symbiotic from *Rhizobium etli*. *Plasmid*, 2004, 51: 203–216.
- [7] Watson RJ, Heys R. Replication regions of *Sinorhizobium meliloti* plasmid. *Plasmid*, 2006, 55: 87–98.
- [8] Burgos PA, Velázquez E, Toro N. Identification and distribution of plasmid-type A replicator region in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9: 843–849.
- [9] Bartosik D, Baj J, Włodarczyk M. Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology*, 1998, 144: 3149–3157.
- [10] Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourge G, et al. Uncoverential genomic organization in the alpha subgroup of the proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 2749–2755.
- [11] Cevallos MA, Cervantes-Rivera R, Gutiérrez-Ríos RM. The *repABC* plasmid family. *Plasmid*, 2008, 60: 19–37.

- [12] Pappas KM. Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. *Plasmid*, 2008, 60: 89 – 107.
- [13] 胡国元, 周俊初. 华癸中生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 研究进展. 华中农业大学学报 (*Journal of Huazhong Agricultural University*), 2006, 25(2): 213 – 218.
- [14] Hu GY, Li YG, Zhou JC. Biological characteristics of plasmids of *Mesorhizobium huakuii* HN3015 from *Astragalus sinicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23: 845 – 851.
- [15] Hu GY, Li YG, Zhou JC. Incompatibility behavior of a megaplasmid pMHHN3015c in *Mesorhizobium huakuii* HN3015. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 1281 – 1287.
- [16] Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1978, 1: 584 – 588.
- [17] 周焱, 夏薇, 于晨红, 等. 费氏中华根瘤菌 (*Sinorhizobium fridii*) 质粒复制基因 *repC* 系列多样性的研究. 华中农业大学学报 (*Journal of Huazhong Agricultural University*), 2005, 24(6): 537 – 543.

Cloning and identification of the plasmid replication gene *repC* in *Mesorhizobium huakuii*

Guoyuan Hu^{1*}, Shanming Wang², Weiwei Li¹, Youguo Li²

(¹ Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073, China)

(² State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] The *repC* gene is the principal initiation protein gene for plasmid replication. We identified the *repC*-like sequences from *Mesorhizobium huakuii* strain HN3015 and its derivatives of plasmid curing. [Methods] Primers of RC1 and RC3 were used to amplify the *repC*-like sequences by a polymerase chain reaction, the PCR products were obtained and cloned into plasmid vector pMD-18T and then sequenced. Location of the *repC* sequences on different plasmids in the strains tested was carried out by Southern blotting. The nucleotides homology analysis of the *repC* gene was carried out using the BLAST. Amino acid sequences were deduced using the ExPASy. Multiple sequences alignments were performed using the ClustalW. Analysis of protein secondary structure was carried out using the PredictProtein. [Results] The *repC*-like sequences were obtained from the strains tested. The sizes of the PCR products were about 750 bp. The results of Southern blotting showed that the *repC*-like sequences were only associated with a plasmid in the stains tested. [Conclusions] The *repC* sequences of the strains tested showed 100% sequence similarity, but were obviously different from that of other rhizobia strains.

Keywords: *Mesorhizobium huakuii*; *repC*; PCR amplification; Identification

(本文责编: 张晓丽)