

## 中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 自体诱导物合成酶基因的克隆及对生理功能的影响

曲媛, 杨梦华, 郑会明, 钟增涛\*, 朱军

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】从中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp. 1128 中克隆自体诱导物合成酶基因, 从而研究该基因在 *Sinorhizobium* sp. 1128 群体感应系统中的作用。【方法】利用基因序列同源性比对以及分子克隆的方法, 从中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp. 1128 中克隆自体诱导物合成酶基因; 利用大肠杆菌异源表达、C<sub>18</sub> 反相薄层层析(TLC)的方法研究该基因的特性; 通过中间片段融合的方法缺失该基因, 并通过结瘤实验研究该基因对 *Sinorhizobium* sp. 1128 生理功能的影响。【结果】以草木樨中华根瘤菌 *Sinorhizobium medicae* WSM419 自体诱导物合成酶基因 *Smed\_1560* 序列设计引物, 通过 PCR 扩增在 *Sinorhizobium* sp. 1128 中找到一新的自体诱导物合成基因, 命名为 *traI2*。该基因在大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中表达后能产生两种自体诱导物分子。在 *Sinorhizobium* sp.1128 中将该基因缺失, 自体诱导物活性下降; 回复突变后, 自体诱导物活性得到恢复, 结瘤实验结果表明该基因能影响根瘤菌的结瘤效率。【结论】中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp. 1128 群体感应系统是一个复杂的交互系统, 它对结瘤的生理功能具有一定的影响。

**关键词:** *Sinorhizobium* sp. 1128; 群体感应; 自体诱导物合成酶

**中图分类号:** Q78   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1314-05

单细胞细菌通过产生可扩散的小分子量信号分子用于细胞间的通讯, 这一现象被称为“群体感应”(Quorum sensing)<sup>[1,2]</sup>。目前已经有多种微生物相关的化学信号分子被发现, 这些物质大体可分为三类: 一类是氨基酸和短肽类, 主要作用于革兰氏阳性细菌, 另一类是脂肪类的衍生物, 主要作用于革兰氏阴性细菌。大多数(但非全部)都属于 N-酰化高丝氨酸内酯(AHL)<sup>[3]</sup>。第三类信号分子是二酮哌嗪类化合物(DKP), 已在 *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *Enterobacter agglomerans* 和 *Citrobacter freundii* 中发现<sup>[4]</sup>。在此三类信号分子中 AHLs 的多样性最为丰富, 而且在不同的细菌中其调控的生理性状也各不相同, 因此对 AHLs 的生物学特性研究也最为复杂和有趣。

根瘤菌存在的群体感应系统通常是多层次、复杂的、交互的。目前对豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* bv.viciae) 群体感应系统的研究最为详细。它含有 4 个群体感应系统 (*rai*, *rhi*, *cin* 和 *tra*), 产生 6 种 AHLs 分子 (包括一个特殊的 C<sub>7</sub>-HSL)<sup>[5]</sup>。苜蓿根瘤菌 CNPAF512 菌株的 *rai* 和 *cin* 基因定位在染色体上, 共产生 7 种 AHLs, 这些 AHLs 影响苜蓿根瘤菌的生长<sup>[6]</sup>。中华苜蓿根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) Rm1021 的基因组序列完成后, 发现了与 *luxR/luxI* 同源的另一组基因, 命名为 *sinR/sinI* 系统<sup>[7]</sup>。进一步研究发现, 该系统负责一些新的 AHLs 的合成, 如 C12-HSL, 3-oxo-C<sub>16:1</sub>-HSL, C18-HSL 等。

汪洋等<sup>[9]</sup>进行的中华根瘤菌 *Sinorhizobium*

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30770074, 30570011)

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

作者简介: 曲媛(1983-), 女, 山东人, 硕士研究生, 从事根瘤菌群体感应研究。E-mail: quyuan198318@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-03-27; 修回日期: 2008-05-08

sp.1128 自体诱导物合成酶基因的筛选研究发现了一个自体诱导物合成酶基因 *traI*, 它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%, 将其缺失后发现缺失株仍能产生部分信号分子。而通过基因序列同源性比对分析发现, *S. medicae* WSM419 中共有 3 个自体诱导物合成酶基因, 因此我们推测中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 中还可能存在其它的自体诱导物合成酶基因。本研究以 *S. medicae* WSM419 的一个自体诱导物合成酶基因

*Smed\_1560* 序列为模板设计引物, 通过 PCR 扩增获得了中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 的另一自体诱导物合成酶基因 *traI2*, 通过对该基因的缺失研究它在中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 群体感应调控过程中发挥的作用, 对进一步了解中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 的群体感应系统奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 表 1 为本试验所用菌株和质粒。

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		
<i>Sinorhizobium</i> sp.1128	Wild type	This laboratory
<i>Sinorhizobium</i> sp. YW0	Derivative of 1128, Spontaneous Sm <sup>R</sup>	This laboratory
<i>Sinorhizobium</i> sp. YW1	AI mutant of YW0 with a transposon inserted in <i>traI</i>	This laboratory
<i>Sinorhizobium</i> sp. QY1	Derivative of YW0 carrying a <i>traI2-lacZ</i> , $\Delta traI2$	This study
<i>Sinorhizobium</i> sp. QY2	Derivative of YW1 carrying a <i>traI2-lacZ</i> , $\Delta traI, \Delta traI2$	This study
<i>Sinorhizobium</i> sp. QY3	Derivative of QY1 carrying pQY1	This study
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	A. tumefaciens R10; Ti <sup>-</sup> , autoinducer bioassay strain	This laboratory
KYC55(pJZ372)(pJZ384)(pJZ410)	Produces autoinducer 3-O-C <sub>8</sub> -HSL, as a positive control	This laboratory
<i>A. tumefaciens</i> R10(pCF218)		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Standard cloning host, host of pYC12	This laboratory
Plasmids		
pYW1	pYC12 derivative carrying intact <i>traI</i> gene, Gm <sup>R</sup>	This laboratory
pQY1	pYC12 derivative carrying intact <i>traI2</i> gene, Gm <sup>R</sup>	This study
pQY3	pVIK112 derivative carrying internal <i>traI2</i> fragment, Km <sup>R</sup>	This study

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、LB 培养基中 28℃ 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 mg/mL; 庆大霉素(Gm)为 100  $\mu$ g/mL。R10 所用四环素(Tc)为 2  $\mu$ g/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器: 各种限制性内切酶购自 Fermentas 公司; ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside, 邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷), IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, 异丙基- $\beta$ -硫代半乳糖苷), X-Gal 购于 Sigma 公司; C<sub>18</sub> 反相薄层析板购于 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 测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.2 自体诱导物合成酶基因的克隆

根据 *Sinorhizobium medicae* WSM419 的信号分

子合成酶基因的基因序列以及载体 pYC12 上的多克隆位点的特征, 设计合成了以下引物: 上游引物: 5'-GCGCCATATGATCAGGATAGTAAAC-3' 下游引物: 5'-GCGAAGCTTAAGCGGCACGCGCCGTTTCG-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 *Sinrhizobium* sp. YW0 的基因组总 DNA 为模板扩增目的基因。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 循环 30 次; 72℃ 10 min。PCR 产物纯化后连入 pMD19-T 载体, 测序。

### 1.3 自体诱导物合成酶基因表达质粒的构建

将连入 pMD19-T, 已测序的质粒与载体 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 $\alpha$ ; 再通过酶切验证以得到阳性重组子。阳性重组子培养物上清进行定量 AHL 活性显色和定性的 TLC 分析。

### 1.4 中间片段融合质粒的构建

在已获得的自体诱导物合成基因的中间选取选

取一段 500 bp 左右的片段, 以载体 pVIK112 上的多克隆位点的特征设计一对引物。PCR 扩增, 产物连入 pMD-19T 载体, 通过酶切验证以得到阳性重组子。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, 电转入 *E. coli* (BW20676); 再通过酶切验证以得到阳性重组子。

**1.5 自体诱导物活性检测与 C<sub>18</sub> 反相薄层层析(TLC)**  
按照文献[8]进行操作。

### 1.6 自体诱导物合成基因缺失株的构建

采用两亲接合的方法, 供体菌为带有构建好的中间片段融合质粒的 *E. coli* BW20676, 受体菌分别为 *Sinorhizobium* sp. YW0、*Sinorhizobium* sp. YW1, 得到的接合子, 经 PCR 验证正确, 即为自体诱导物合成基因缺失株, 其培养物上清进行定量 AHL 活性显色和定性的 TLC 分析。

### 1.7 自体诱导物合成基因缺失株回复突变株的构建

采用接合的方法将已构建好的自体诱导物合成酶基因表达质粒电转入自体诱导物合成基因缺失株中, 得到转化子, 提质粒验证正确后, 取其培养物上清进行定量 AHL 活性检测。

### 1.8 结瘤实验

草木樨种子经过表面消毒、催芽后, 在培养至  $OD_{600}=2.0$  左右的菌液中浸泡 15 min, 种入装有灭过菌的蛭石的盆钵内, 每盆四棵苗, 再分别接种 100  $\mu$ L 菌液, 同时接种 TY 培养基作为阴性对照。浇灌灭过菌的无氮营养液。种植 30 d 后收获植株的根系并用自来水小心冲洗干净, 计数植株根部的结瘤数目。

## 2 结果

### 2.1 *Sinorhizobium* sp.1128 自体诱导物合成基因 *traI2* 的克隆及表达

以野生型 *Sinorhizobium* sp.1128 总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出目的基因, 得到约 650 bp 大小的片段, 命名为 *traI2*, 将该片段克隆到 pMD19-T 载体。经序列测定与基因同源性比对发现与 *Sinorhizobium medicae* WSM419 的 *Smed\_1560* 基因的同源性为 99%, 氨基酸序列同源性达 100%。将其克隆到广宿主范围表达载体 pYC12, 得到异源表达 *traI2* 基因的质粒 pQY1, 并转入 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中, 得到大肠杆菌重组表达菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pQY1)。用检测菌株 JZA1<sup>[8]</sup>对其培养上清液进行 AHL 活性检测。检测结果(图 1-A)显示 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (pQY1) 培养上清液中具有自体诱导物活性。TLC 检测结果

(图 1-B)表明在大肠杆菌中 *traI2* 负责合成两种 AHL 分子。

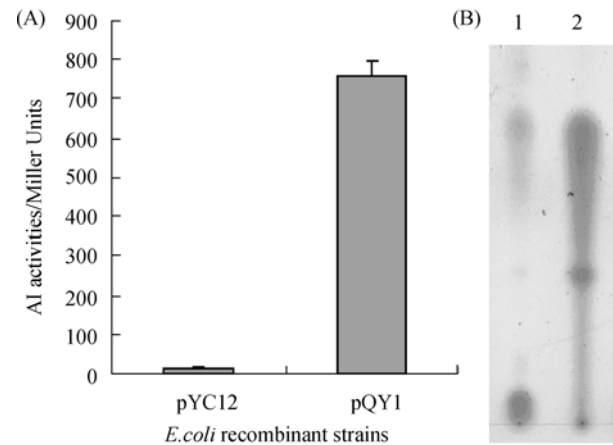


图 1 大肠杆菌重组自体诱导物活性(A)及 TLC 分析(B)  
Fig. 1 Assay for AHL activity (A) and AHL content (B) of the cell-free supernatants of *E. coli* recombinant strain. 1: *E. coli* (pQY1), 2: R10.

### 2.2 *Sinorhizobium* sp.1128 自体诱导物合成酶基因缺失株的构建及 AHLs 活性检测

用中间片段融合的方法获得 *traI2* 基因缺失株 *Sinorhizobium* sp.QY1, 以及 *traI*, *traI2* 基因双缺失株 *Sinorhizobium* sp.QY2。利用本实验室构建的酰基高丝氨酸内酯(AHL)超敏感菌株 JZA1 对自体诱导物合成基因缺失菌株培养液上清进行 AHL 活性检测, 上清显色结果(图 2-A)表明在野生型中缺失 *traI2* 基因后, 自体诱导物活性下降至 60%左右, TLC 检测结果显示(图 2-B)极性最大的点颜色变淡; 在 *traI* 突变株 *Sinorhizobium* sp.YW1 中缺失 *traI2* 后, 自体

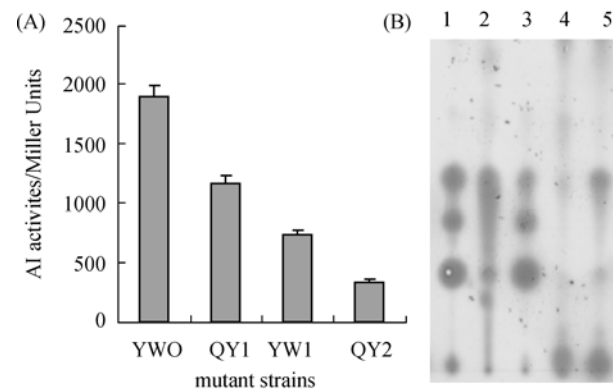


图 2 不同突变株自体诱导物活性及 TLC 分析  
Fig. 2 Assay for AHL activity (A) and AHL content (B) of the cell-free supernatants of different mutant strains. 1: YW0, 2: R10, 3: QY1, 4: QY2, 5: YW1.

诱导物活性下降约十倍, TLC 检测显示 *Sinorhizobium* sp.YW1 中产生的点基本消失。因此我们推测 *traI2* 主要负责合成极性最大的 AHL, 且其合成的量较低。

为了进一步研究 *traI2* 基因的功能, 以草木樨

(*Melilotus suaveolens* Ledeb) 为宿主做结瘤实验。接种各突变菌株 30 d, 计数植株根部的结瘤数目。实验结果 (表 2) 表明 *traI2* 基因缺失后结瘤率降低, 但不会完全丧失, 而 *traI* 对结瘤率没有影响。

表 2 结瘤实验结果

Table 2 nodulation result of inoculating different *Sinorhizobium* sp. mutants into *Melilotus suaveolens* Ledeb

Inoculated	Relevant phenotypes	Average No. of nodules/plant (% of plants nodulated)
<i>Sinorhizobium</i> sp. YW0	Wild type	8.3(100%)
<i>Sinorhizobium</i> sp. QY1	$\Delta traI2$	3.4(100%*)
<i>Sinorhizobium</i> sp. YW1	$\Delta traI$	9.2(100%)
<i>Sinorhizobium</i> sp. QY2	$\Delta traI2, \Delta traI$	7.9(100%)
CK		0(0%)

2.3 自体诱导物合成酶基因 *traI2* 的突变及其功能回复  
通过接合的方法将 *traI2* 超表达质粒 pQY1 转入 *traI2* 基因突变株 *Sinorhizobium* sp.QY1, 获得接合子 *Sinorhizobium* sp.QY3, 上清显色结果 (图 3) 表明缺失株中自体诱导物的活性得到恢复。这说明突变株中自体诱导物活性的降低与 AHL 分子的减少正是由于基因的插入失活而非极性效应引起的。

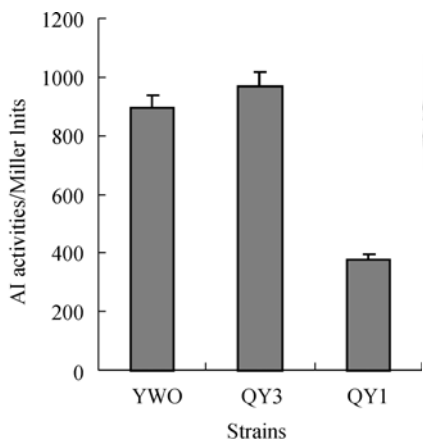


图 3 不同菌株自体诱导物活性检测  
Fig. 3 Assay for AHL activity of the cell-free supernatants of different bacterial strains.

### 3 讨论

汪洋等<sup>[9]</sup>通过转座子插入突变的方法筛选到中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 的一个自体诱导物合成酶基因 *traI*, 其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%<sup>[9]</sup>。但通过对 *S.medicae* WSM419 基因组序列分析发现, 其基因组中还有两个与自体诱导物合成酶基因高度同源的序列(*Smed\_1560, Smed\_6489*), 本研究以这两个

自体诱导物合成酶基因序列为模板设计引物, 通过 PCR 扩增, 在 *Sinorhizobium* sp.1128 中找到了一个大小为 645 bp 的自体诱导物合成酶基因 *traI2*, 经比对它与 *S. medicae* WSM419 的 *Smed\_1560* 基因的同源性有 99%, 氨基酸序列同源性 100%。将该基因在大肠杆菌 *E.coli* DH5 $\alpha$  中过量表达后, 经 TLC 检测发现它在大肠杆菌中合成两种自体诱导物分子。在 *Sinorhizobium* sp.1128 中将 *traI2* 缺失后, 缺失株的自体诱导物活性下降, TLC 检测极性最大的点变淡, 而回复突变后, 自体诱导物的活性得到恢复。这说明通过基因同源比对方法所找到的基因确实具有自体诱导物合成酶基因的功能, 同时也说明 *traI2* 主要负责合成反向薄层层析中极性最大的 AHL, 且合成量较小。由于其负责合成的 AHL 量较少, 与 *traI* 相比, *traI2* 缺失后自体诱导物活性下降幅度不大, 因此用前期的转座子插入失活的方法很难将其筛选出来。

根瘤菌中群体感应系统所起的作用是复杂多样的。对苜蓿根瘤菌 CNPAF512 的研究发现, *cin* 系统与根瘤的正常发育密切相关, *cinI* 和 *cinR* 的突变导致植物固氮能力的下降, 并且产生非正常的类菌体形态和发育<sup>[6]</sup>。而 *rai* 系统受 *cinI* 所产生 AHLs 的正调控, *raiI* 突变株可以极大的增加结瘤数量。苜蓿根瘤菌的另一菌株 CFN42 的 p42a 质粒的 *tra* 并不直接影响共生固氮, 可能间接影响 p42a 的接合转移, 除了 *traI* 产生的 3-oxo-C8-HSL 外该菌还能产生 3OH-C8-HSL, 但其确切功能和合成酶基因还不清楚。本研究的实验结果证明中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 中至少有两个自体诱导物合成酶基因, 通过结瘤实验证明这些基因对结瘤的影响不同, 其中 *traI2* 对结瘤的影响较大, 但不能完全调控该功能。通过对 *S.medicae* WSM419

基因组序列分析发现, 自体诱导物合成酶基因 *Smed\_1560* 位于染色体上, 其上游是一个 *luxR* 基因, 因此我们推测, *traI2* 可能也位于 *Sinorhizobium* sp.1128 的染色体上。本实验中, 通过同样的方法, 我们在 *Sinorhizobium* sp.1128 中还克隆到了相应的 *luxR* 基因。在 *luxI/luxR* 群体感应体系中, *luxR* 蛋白通常都对 *luxI* 基因的表达具有正向调控的作用。因此 *luxR* 对 *traI2* 的表达调控还需要进一步的研究。另外, 以 *S.medicae* WSM419 的 *Smed\_6489* 序列设计的引物并没能从 *Sinorhizobium* sp.1128 中扩增出相应的基因。可能是因为该基因的片段太小, 只有 300 bp 左右, 也可能是该基因的同源性不高。有趣的是当 *traI*, *traI2* 同时缺失时结瘤能力反而不受影响, 可能因为根瘤菌的群体感应过程是一个复杂、交互的过程, 具体群体感应各基因在中华根瘤菌 *Sinorhizobium* sp.1128 群体感应体系中所起的功能叠加与单独作用的效果不同, 具体的原因需进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001, 55: 165–199.
- [2] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176: 269–275.
- [3] Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, *et al.* Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbio Rev*, 2001, 25: 365–404.
- [4] Schauder S, Bassler BL. The languages of bacteria. *Genes & Development*, 2001, 15(12): 1468–1480
- [5] Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, *et al.* 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* Locus and the Production of Novel N-Acyl Homoserine Lactones. *Journal of Bacteriology*, 184: 5686–5695.
- [6] Daniels R, De Vos DE, Desair J, *et al.* The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277: 462–468.
- [7] Fuqua WC, Winans SC. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*. 1994. 176: 2796–2806.
- [8] Zhu J, Chai YR, Zhong ZT, *et al.* *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environmental Microbiol*, 2003, 69: 6949–6953.
- [9] 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)*, 47(5): 838–842.

## Recombinant expression of an autoinducer synthase of *Sinorhizobium* sp.1128 in *Escherichia coli*

Yuan Qu, Menghua Yang, Huiming Zheng, Zengtao Zhong\*, Jun Zhu

(Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the roles of quorum sensing system in establishing symbiosis between bacterium *Sinorhizobium* sp.1128 and its plant host *Melilotus suaveolens* Ledeb. [Methods] According to homologous analysis, we designed primers to amplify the autoinducer synthase encoding genes in *Sinorhizobium* sp.1128 according to *Sinorhizobium medicae* WSM419 genome sequences. The autoinducer synthase encoding genes were cloned into the expression vector of pYC12 and expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Thin-layer chromatography (TLC) assay was used to study their roles in autoinducer production. A duplicated inactivation of the gene was used to explore its function in plant nodulation. [Results] Homologous analysis showed that at least three annotated acylated homoserine lactone (AHL) synthase genes existed in *Sinorhizobium medicae* WSM419 genome. We cloned these three autoinducer synthase genes in *Sinorhizobium* sp.1128. One of these genes named *traI2* was over expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . At least two different AHLs were produced by the recombinant strain. Disruption of *traI2* reduced both the autoinducers (AI) activities and AHL production by TLC detection. Furthermore, the complementation of *traI2* reverted the phenotype of AI activities. These findings demonstrate that *traI2* was responsible for AI synthesis in *Sinorhizobium* sp.1128. More important, the *traI2* deficient strains were defective in nodule formation on their host plant. [Conclusion] The quorum sensing circuits in *Sinorhizobium* sp.1128 may play an important role in symbiosis between plant and bacterium.

**Keywords:** *Sinorhizobium* sp. 1128; quorum sensing; autoinducer synthetase