

利用细菌双杂交文库筛选华癸中慢生根瘤菌 7653R 中与外膜蛋白 Opa22 互作的蛋白

李一星 李芳 周鑫兰 谢福莉 李友国

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为研究华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R 外膜蛋白 Opa22 在共生固氮过程中的作用机制, 构建了细菌双杂交基因组随机文库, 并以 Opa22 为诱饵, 钓取与其相互作用的候选靶蛋白。结果获得 12 个与 Opa22 蛋白互作的阳性克隆, 为后续研究 Opa22 的作用机制提供了新的线索和思路, 同时也为开展根瘤菌蛋白互作的研究构筑了良好的技术平台。

关键词 华癸中慢生根瘤菌 7653R; 细菌双杂交文库; 共生固氮; Opa22; 互作蛋白

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0028-06

根瘤菌和豆科植物的共生固氮是一个多基因参与的复杂过程, 涉及到多种细胞信号传递途径及多个蛋白的相互作用^[1-2]。随着愈来愈多根瘤菌基因组测序的完成, 更多的学者开始致力于共生固氮中蛋白互作网络的研究, 以期从蛋白互作的角度进一步完善对根瘤菌共生固氮分子机理的认识。细菌双杂交系统是一种在细胞内研究蛋白质互作的有效方法, 与酵母双杂交系统相比, 它具有如下一些优点: 大肠杆菌比酵母菌生长繁殖快、转化效率高、遗传操作方便, 可进行快速高通量的研究; 检测灵敏度高, 降低了假阳性和假阴性的发生率^[3]; 适用范围广, 可用于研究膜蛋白的相互作用^[4]等。因此细菌双杂交系统被广泛应用于功能基因组学的研究, 目前该系统也已被应用于固氮领域的研究。如廖贡献等^[5]利用大肠杆菌双杂交系统研究了阴沟肠杆菌固氮调节蛋白 NifL 和 NifA 的相互作用; 王应祥等^[6]建立了大豆根系细菌双杂交的 cDNA 文库, 从中钓取并获得与 GmWnk1 互作的蛋白。

华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R 可以与豆科植物紫云英共生固氮。前期工作中我们利用 Tn5 转座子插入突变体库, 从该菌中分离克隆到一个与早期结瘤相关的新基因 *opa22*, 它编码一个含有 257 个氨基酸残基的蛋白^[7]。Blastn 分析发现 *opa22* 同源基因存在于多个种属根瘤菌

及相关近缘细菌中。结构域分析表明 Opa22 蛋白属于外膜蛋白, 具有 β -barrel 结构域, 与不透明蛋白及相关的表面抗原 COG3637、表面抗原 2 家族以及外膜蛋白 OmpW 家族具有较高同源性^[8]。这 3 个家族在许多动植物的病原菌中均存在, COG3637 家族参与细菌与宿主的相互识别、附着和侵染^[9]; 表面抗原 2 家族可保护病原菌免受宿主免疫反应的伤害, 引起免疫逃逸^[10]; 而 OmpW 家族可保护细菌, 抵抗抗生素等不良因素的胁迫, 免受宿主细胞的吞噬^[11-12]。前期研究表明 *opa22* 的突变株不能在紫云英根部结瘤, 干扰了侵入线的形成。因此推测, Opa22 可能参与根瘤菌与宿主之间的相互识别, 在侵染过程中发挥作用。为了研究该蛋白在共生固氮过程中的作用机制, 本研究构建了华癸中慢生根瘤菌 7653R 细菌双杂交基因组随机文库, 旨在筛选与 Opa22 互作的候选靶蛋白, 为后续的深入研究提供新的线索、思路和材料。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

报告菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-Blue、细菌双杂交载体 pBT 和 pTRG 均购自 Stratagene 公司; 华癸中慢生根瘤菌 7653R (*M. huakuii* 7653R)、大肠杆菌 DH5 α 和 DH10B 均为华中农业

收稿日期: 2013-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371549)、国家“973”计划项目(2010CB126502)和博士点基金项目(20110146110012)

李一星, 博士, 讲师。研究方向: 根瘤菌共生固氮的分子机理。E-mail: liyixing39@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 李友国, 博士, 教授。研究方向: 生物固氮、农业环境微生物。E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮研究室保存。ExTaq酶、T4连接酶(Fermentas)、各种限制性内切酶为Fermentas公司产品;Alkaline Phosphatase, Calf intestine(CIAP)购自Promega公司;DNA分子量标准购自广州东盛生物科技有限公司。

1.2 华癸中慢生根瘤菌7653R基因组DNA的提取

挑取新鲜的 *M. huakuii* 7653R 单菌落,接种于4 mL TY 液体培养基,置于28 °C 振荡培养2~3 d, 12 000 r/min 离心收集菌体,用STE缓冲液洗涤3次后重悬于1 mL 高浓度的TE缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA)。然后加入终质量浓度为0.5 mg/mL 的溶菌酶,37 °C 孵育30 min 后加入10%的SDS至终质量分数为1%,充分混匀再加入5 mol/L NaClO₄使其终浓度为1 mol/L,37 °C 保温至菌液透明,分别使用等体积的苯酚-氯仿、氯仿抽提。抽提后上清液使用1倍体积的异丙醇处理,最后离心收集沉淀,干燥后溶于去离子水,通过琼脂糖凝胶电泳检测所制备的根瘤菌基因组DNA的质量。

1.3 细菌双杂交文库的构建

将基因组DNA用Sau3A I进行部分酶切,琼脂糖凝胶电泳检测后回收1.5~3.0 kb的DNA片段。抽提pTRG质粒,用Sau3A I的同尾酶BamH I单酶切4 h,使其线性化,然后对线性化的质粒用CIAP去磷酸化处理。分别取等量的去磷酸化前后的质粒pTRG转化大肠杆菌DH5 α ,检测去磷酸化效果,当二者转化子的数量达到100:1时说明载体去磷酸化效果较好。将纯化后的基因组DNA部分酶切片段和去磷酸化的pTRG载体,按照质量比4:1的比例,用T4连接酶16 °C 连接过夜。配制8个同样的连接体系,酶连后分别转化8组大肠杆菌DH10B的高效感受态细胞,将菌液全部涂布于40个添加了四环素的LB平板,置于30 °C 培养14 h,待菌落长出之后计算文库覆盖率。文库覆盖率根据Clarke-Carbon公式计算: $N = \ln(1 - P) \div \ln(1 - f)$,其中 f 为插入片段大小与全基因组总DNA大小的比值, N 为克隆数。将40个平板中的克隆全部刮下,置于含有15%甘油的LB液体培养基中,-80 °C 保存。

1.4 文库的检测与保存

随机挑取24个文库转化子进行菌落PCR以检测插入片段的大小,采用的引物为5'-TGGCTGAACAAGCT-3'和5'-ATTCGTCGC-

CCGCCATAA-3'。按照100 μ L/管分别从80个甘油管中吸取菌液,加入200 mL LB+Tet液体培养基中,30 °C 振荡培养过夜,次日收集菌体并抽提文库转化子的混合质粒,作为华癸中慢生根瘤菌7653R细菌双杂交文库,于-80 °C 保存。

1.5 诱饵质粒构建及检测

1)诱饵质粒构建。以华癸中慢生根瘤菌7653R基因组DNA为模板,采用引物5'-TTTT CCTTTTGC GGCCGCAATGACTCACATTG - CGTATTGTG-3'和5'-CCGCTCGAGGACT AC-CAGAGATCGTAGCGCAGTCC-3' PCR扩增 *opa22* 基因编码区,用Not I和Xho I双酶切,插入质粒pBT,经测序后得到诱饵质粒pBT_{opa22}。

2)诱饵质粒自激活检测。将质粒pBT_{opa22}和pTRG共转化报告菌株,分别取共转化菌株、正对照和负对照菌株的单菌落至4 mL LB液体培养基中,30 °C 振荡培养18 h,然后分别取3 μ L菌液,点种于NSSM和DSSM平板上,观察、比较菌株在2种培养基上的生长情况,以检测诱饵的自激活活性。

1.6 细菌双杂交文库的筛选

将诱饵质粒pBT_{opa22}转化报告菌株 *E. coli* XL1-Blue,经PCR验证后挑取正确的阳性克隆,按照Inoue法制备高效感受态细胞。取10 μ L文库混合质粒转入5组感受态细胞中,涂布含有氯霉素和四环素的LB平板,于37 °C 培养。待菌落长出后,用无菌牙签挑取共转化子分别对应地点种于NSSM和DSSM平板上,37 °C 培养。培养12 h后观察菌落的生长情况并记录,然后将平板继续放入37 °C 培养,每隔8 h观察和记录菌落生长情况,直到培养72 h终止。最后将72 h内能够同时在NSSM和DSSM平板上生长的菌落挑出保存。

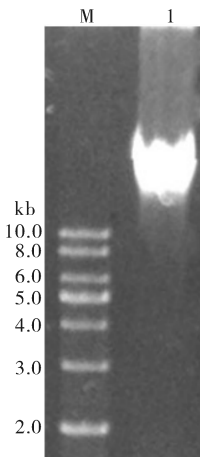
1.7 阳性克隆的检测

采用菌落PCR的方法检测阳性克隆中插入片段的大小。抽提阳性克隆中的质粒,并将抽提物转化大肠杆菌DH5 α ,涂布含有四环素的LB平板,37 °C 培养。待菌落长出后,用牙签将各单菌落分别点种于分别含有四环素、氯霉素加四环素的两种LB平板,在前者能够生长而在后者不能生长的菌落,即为仅含有pTRG重组质粒的克隆。分别挑取这些单菌落接种至含有四环素的LB液体培养基中,30 °C 振荡培养16 h后抽提质粒,进行酶切验证和测序。将测序结果在NCBI数据库中进行Blast比对分析。

2 结果与分析

2.1 华癸中慢生根瘤菌 7653R 基因组 DNA 的提取与检测

高质量的基因组总 DNA 对于文库的构建非常重要,因此需对提取的根瘤菌基因组 DNA 进行检测。首先利用紫外分光光度计测定样品的吸光度,结果表明:样品的 D_{260} 为 0.55;样品 D_{260}/D_{280} 为 2.0,说明没有蛋白质或酚类物质污染; D_{260}/D_{230} 为 8.6,说明没有碳水化合物等污染; D_{320} 为 0.0,说明样品比较纯净。其次,用琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 质量发现:DNA 条带亮度较高,且清晰无降解(图 1)。以上结果说明制备的根瘤菌基因组 DNA 质量较高,符合实验要求。



泳道 1: *M. huakuii* 7653R 基因组 DNA Lane 1: Genomic DNA of *M. huakuii* 7653R; M: DNA marker.

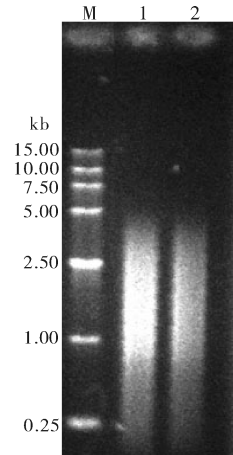
图 1 华癸中慢生根瘤菌 7653R 基因组 DNA 的电泳检测

Fig. 1 Detection of genomic DNA from *M. huakuii* 7653R by agarose gel electrophoresis

2.2 华癸中慢生根瘤菌 7653R 细菌双杂交文库的构建

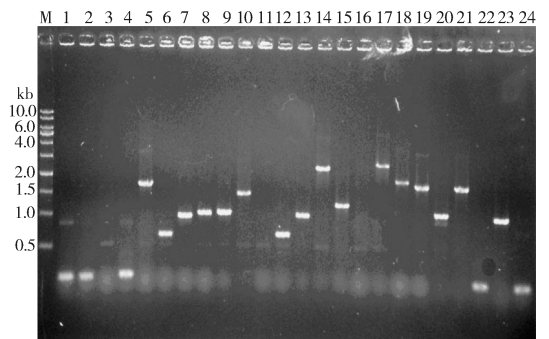
根瘤菌基因组 DNA 用 *Sau3A* I 进行部分酶切预实验,通过改变酶量确定最佳反应条件为:10 μ g 总 DNA 的最佳酶用量为 0.078 125 U,此时酶切产物的主带刚好位于 1.5~4.0 kb 范围。然后将反应体系扩大至 1.2 mL,回收主带为 1.5~3.0 kb 的 DNA 片段,并利用 Marker 进行定量,确定其质量浓度为 50 ng/ μ L。文库载体 pTRG 用 *Bam*H I 线性化处理并回收大小为 4.4 kb 的酶切片段(图 2);然后用 CIAP 去磷酸化并利用 Marker 进行定量,其质量浓度为 20 ng/ μ L。将部分酶切回收后的基因组总 DNA 片段与去磷酸化的 pTRG 连接,并转化

大肠杆菌 DH10B 高效感受态细胞,共获得 16 000 个原始阳性克隆,计算得文库覆盖率 $P=99.99\%$,表明该文库以 99.99% 的概率覆盖整个基因组。进一步随机挑取 24 个文库转化子进行菌落 PCR,检测插入片段的大小,结果如图 3 所示:插入片段大小均在 500 bp 以上,主要分布于 1.0~3.0 kb,且长度具有多态性,表明所构建的文库达到了预期质量。



泳道 1~2: 部分酶切回收产物 Lane 1-2: Products of partially digested *M. huakuii* 7653R genomic DNA purified by gel extraction; M: DNA marker.

图 2 *M. huakuii* 7653R 基因组 DNA 的部分酶切
Fig. 2 Partial digestion of genomic DNA isolated from *M. huakuii* 7653R



泳道 1~24: 菌落 PCR 检测随机挑取的阳性克隆 Lane 1-24: Inserted DNA fragments in randomly picked clones from the library; M: DNA marker.

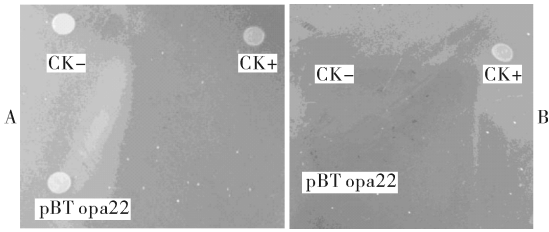
图 3 文库插入片段大小的检测

Fig. 3 Size detection of the inserted DNA fragments in the library

2.3 诱饵载体的构建和自激活检测

以华癸中慢生根瘤菌 7653R 基因组 DNA 为模板,扩增 *opa22* 基因全长,预期大小为 788 bp,琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物大小符合预期。产物经回

收测序后用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切与质粒 pBT 连接,得到诱饵质粒 pBT_{opa22},经 PCR 和测序验证正确后,将 pBT_{opa22} 和空的 pTRG 共转化报告菌株 *E. coli* XL1-Blue,检测自激活活性。结果发现培养至 72 h,共转化菌株未在 DSSM 平板上生长而在 NSSM 上生长良好(图 4),由此判断 Opa22 蛋白在本研究所使用的细菌双杂交筛选系统中没有自激活活性,诱饵载体 pBT_{opa22} 可以用于候选靶蛋白的筛选。



A: 不加链霉素和 3-AT 的 NSSM 平板检测结果,所有菌株均有生长 The result on NSSM plate without streptomycin and 3-AT, all the strains grew normally; B: 添加链霉素和 5 mmol/L 3-AT 的 DSSM 平板检测结果,负对照和含有诱饵质粒 pBT_{opa22} 的菌株均不生长 The result on DSSM plate with streptomycin and 5 mmol/L 3-AT, the negative control and recombinant strain harboring pBT_{opa22} could not grow.

图 4 诱饵质粒 pBT_{opa22} 的自激活活性检测
Fig. 4 Detection of the auto-transcriptional activation of pBT_{opa22}

2.4 Opa22 互作蛋白的筛选及分析

将文库混合质粒转入含有诱饵质粒的报告菌株的高效感受态细胞中,进行细菌双杂交筛选,结果获得能够在 DSSM 平板上生长的阳性克隆 21 个。菌落 PCR 检测这 21 个阳性克隆所含有的插入片段,发现其大小均在 2.0 kb 左右。将其中的 pTRG 重组质粒测序,在 NCBI 数据库中进行 Blastn 和 Blastp 比对,发现有 9 个为假阳性,其余 12 个的比对结果见表 1。其中,阳性克隆 LF-O66 的插入片段所编码产物的氨基酸序列与百脉根中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium loti* MAFF303099) 的一个假想蛋白 Mlr2785 (497 aa) 的羧基端高度同源,为一种细胞外膜射流蛋白。考虑到 Opa22 也是一种外膜蛋白,属于表面抗原 2 家族成员,基于该线索和对其互作可能性的分析,我们选择 LF-O66 进行进一步的验证。

2.5 阳性克隆 LF-O66 的验证

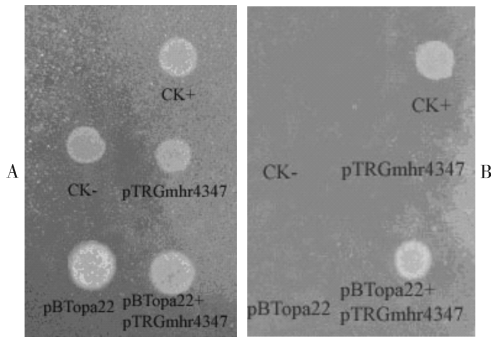
为了验证 LF-O66 中的细胞膜射流蛋白是否能与 Opa22 发生相互作用,将所钓取的基因片段与华癸中慢生根瘤菌 7653R 基因组比对,找到完整的编码区序列(该基因在 *M. huakuii* 7653R 基因组中命名为 *mhr4347*),大小为 1 509 bp。利用 PCR 方法扩增其编码区,克隆于载体 pTRG,得到诱饵质粒 pTRG_{mhr4347}。将 pTRG_{mhr4347} 与 pBT_{opa22}

表 1 与 Opa22 蛋白相互作用的阳性克隆的同源比对分析
Table 1 Blast analysis of the candidate proteins interacting with Opa22

克隆名称 Clone name	插入片段大小/bp Length of insert fragment	氨基酸序列长度 Length of putative amino sequence (aa)	同源性较高的候选靶蛋白 Candidate target protein showed high homology with the positive clone
LF-O8	1 860	277	WD-40 repeat containing beta transducin-like protein
LF-O34	1 995	110	DMSO reductase chain A
LF-O36	1 569	71	Hypothetical protein Mlr1131 (<i>M. loti</i> MAFF303099)
LF-O41	1 811	66	Hypothetical protein Msr7053 (<i>M. loti</i> MAFF303099)
LF-O49	1 901	92	Hypothetical protein Mll0814 (<i>M. loti</i> MAFF303099)
LF-O52	1 952	297	Hypothetical protein Mlr5528 (<i>M. loti</i> MAFF303099)
LF-O53	2 100	176	Amino transferase nifS
LF-O58	1 811	98	Endopeptidase
LF-O59	1 832	149	Hydantoin utilization protein
LF-O60	1 410	92	Hypothetical protein Mll0814 (<i>M. loti</i> MAFF303099)
LF-O65	1 259	107	ATP binding protein
LF-O66	1 873	158	Mlr2785, integral outer membrane efflux protein (<i>M. loti</i> MAFF303099)

共转化报告菌株得到试验组菌株,将 pTRG_{mhr4347} 与 pBT 共转化报告菌株得到对照组菌株。最后将以上 2 组菌株以及正、负对照菌株和 pBT_{opa22} 的自激活检测菌株分别点种于 NSSM 平板和

DSSM 平板,观察培养结果发现试验组菌株能在 DSSM 平板上生长,且 Opa22 和 Mhr4347 蛋白均无自激活作用,表明 Mhr4347 蛋白确实能与 Opa22 蛋白发生相互作用(图 5)。



A: 不加链霉素和 3-AT 的 NSSM 平板检测结果, 所有菌株均有生长 The result on NSSM plate without streptomycin and 3-AT, all the strains grew normally; B: 添加链霉素和 5 mmol/L 3-AT 的 DSSM 平板检测结果, 只有正对照和同时含有 Opa22 和 Mhr4347 的菌株可以生长 The result on DSSM plate with streptomycin and 5 mmol/L 3-AT. Only the positive control and recombinant strain harboring both Opa22 and Mhr4347 could grow.

图 5 细菌双杂交验证 Mhr4347 与 Opa22 的相互作用

Fig. 5 Confirmation of the interactions between Mhr4347 and Opa22 by bacterial two-hybrid system

3 讨论

Opa22 是我们从华癸中慢生根瘤菌 7653R 中分离克隆到的一个外膜蛋白, 其功能与早期根瘤菌的侵染相关。本研究通过构建根瘤菌 7653R 基因组细菌双杂交随机文库, 初步筛选到了 12 个可能与 Opa22 蛋白互作的候选阳性克隆, 研究结果为深入研究 Opa22 在共生固氮中的作用机制提供了新的思路和试验材料。

文库的覆盖率和插入片段的大小对于文库的质量和靶蛋白的筛选十分关键。根据计算, 本研究构建的细菌双杂交文库的覆盖率达 99.99%, 插入片段的长度主要分布在 1.0~3.0 kb 之间且具有多态性, 均符合文库构建的要求。同时与 Opa22 蛋白互作的阳性克隆的获得也证实了该文库的质量和有效性。该文库的构建为开展根瘤菌蛋白互作组的研究提供了良好的技术平台。

在 12 个与 Opa22 互作的候选阳性克隆中, LF-O66 的插入片段编码一种细胞外膜射流蛋白, 我们克隆了其全长编码区基因 *mhr4347*, 在大肠杆菌中进一步验证了 Mhr4347 和 Opa22 蛋白的互作。在革兰氏阴性菌中, 细胞膜外射流蛋白可跨越细胞壁, 将多种物质运输到细胞外, 这些物质包括抗生素、铁载体以及脂类等^[13]。在许多革兰氏阴性病原菌中, 细胞膜射流蛋白的这种运输作用对其致病性

至关重要。如一些病原菌通过射流蛋白将宿主产生的抗生素甚至其他抗菌物质分泌到胞外, 从而使其逃脱宿主的防御机制, 完成侵染过程并在宿主细胞内定殖^[14]。这些射流蛋白主要包括 5 大家族: MF (major facilitator), MATE (multi-drug and toxic efflux), ABC (ATP binding cassette), SMR (small multi-drug resistance) 和 RND (resistance-nodulation division)^[15]。本研究筛选到的 Mhr4347 蛋白属于 MF 家族, 推测它可能与根瘤菌侵染过程中的自我保护有关; 而 Opa22 蛋白可能也与根瘤菌侵染过程中的自我保护相关。因此认为, Mhr4347 和 Opa22 的功能存在一定相关性, 值得深入研究。

除了射流蛋白以外, 另外一个值得注意的是含有 WD40 重复结构域的 β 转导样蛋白。一般认为 WD40 蛋白存在于真核生物中, 具有多种生物学功能, 如参与细胞分裂、光信号感受和传导、花的发育、花青素的合成等^[16-17]。在一些豆科植物中它作为一种泛素连接酶发挥作用, 调控结瘤因子的信号转导途径。例如, 在百脉根中发现的 CERBERUS 蛋白具有保守的 WD40 重复结构域, 该蛋白已被证实与早期侵入线的形成以及根瘤菌在根际的定殖相关^[18]。近年来在细菌中也发现了 WD40 家族的存在。例如天蓝色链霉菌的 WD40 蛋白在细胞分化和次级代谢产物的产生方面发挥作用^[19]。在根瘤菌中目前还没有该家族蛋白的相关报道。因此, 该蛋白也是一个值得进一步研究的候选蛋白。

参 考 文 献

- [1] 王宁, 李一星, 刘燕, 等. 紫云英结瘤受体激酶靶蛋白的筛选与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 6-11.
- [2] 代广中, 袁兆栋, 苟洪兰, 等. 百脉根离子通道蛋白 Pollux 与翻译延伸因子 EF1A 的相互作用[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 34-38.
- [3] JOUNG J K, RAMME E I, PABO C O. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 7382-7387.
- [4] BATESTI A, BOUVERET E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli* [J]. Methods, 2012, 58: 325-334.
- [5] 廖贡献, 寇冠翘, 朱家璧. 细菌双杂交系统的应用和改进[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(3): 331-334.
- [6] 王应祥, 郑焱, 梁翠月, 等. 细菌双杂交筛选大豆 GmWNK1 互作蛋白系统的建立及应用[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(4): 372-378.

- [7] CHENG G J, LI Y G, ZHOU J C. Cloning and identification of *opa22*, a new gene involved in nodule formation by *Mesorhizobium huakuii* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 257(1): 152-157.
- [8] 程国军. 华癸中慢生根瘤菌 7653R 共生固氮相关基因的克隆与功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2006.
- [9] HAUCK C R, MEYER T F. 'Small' talk: Opa proteins as mediators of Neisseria-host-cell communication [J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6: 43-49.
- [10] NOH S M, ZHUANG Y, FUTSE J E, et al. The immunization-induced antibody response to the *Anaplasma marginale* major surface protein 2 and its association with protective immunity [J]. Vaccine, 2010, 28: 3741-3747.
- [11] WU X B, TIAN L H, ZOU H J, et al. Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis[J]. Res Microbiol, 2013, 164: 848-855.
- [12] LIN X M, YANG J N, PENG X X, et al. A novel negative regulation mechanism of bacterial outer membrane proteins in response to antibiotic resistance [J]. Proteome Res, 2010, 9: 5952-5959.
- [13] HAHN A, STEVANOVIC M, MIRUS O, et al. The outer membrane TolC-like channel HgdD is part of tripartite resistance nodulation cell division (RND) efflux systems conferring multiple drug resistance in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120[J/OL]. J Biol Chem, 2013, 288: 31192-31205. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.495598>.
- [14] BUNIKIS I, DENKER K, OSTBERG Y, et al. An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds[J/OL]. PLoS Pathog, 2008, 4(2): e1000009. <http://www.plospathogens.org/article/info/doi/10.1371/journal.ppat.1000009>.
- [15] LI X Z, NIKAIIDO H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria[J]. Drugs, 2004, 64: 159-204.
- [16] SMITH T F, GAITATZES C, SAXENA K, et al. The WD repeat: a common architecture for diverse functions[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24: 181-185.
- [17] KUMAR S, JORDAN M C, DATLA R, et al. The LuWD40-1 gene encoding WD repeat protein regulates growth and pollen viability in flax (*Linum usitatissimum* L.) [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(7): e69124. <http://www.plosone.org/article/info/doi/10.1371/journal.pone.0069124>.
- [18] YANO K, SHIBATA S, CHEN W L, et al. CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis[J]. Plant J, 2009, 60: 168-180.
- [19] ULRYCH A, GOLDOVA J, PETRICEK M, et al. The pleiotropic effect of WD-40 domain containing proteins on cellular differentiation and production of secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor*[J]. Mol Biosyst, 2013, 9: 1453-1469.

Screening proteins interacting with the outer membrane protein Opa22 in *Mesorhizobium huakuii* 7653R with bacterial two-hybrid library

LI Yi-xing LI Fang ZHOU Xin-lan XIE Fu-li LI You-guo

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

Abstract Opa22 is an outer membrane protein identified in *Mesorhizobium huakuii* 7653R in our previous work. To investigate its functions during symbiotic nitrogen fixation, a random genomic DNA library of *M. huakuii* 7653R based on the bacterial two-hybrid system was constructed. The candidate proteins interacting with Opa22 were screened from the library and twelve positive clones were obtained and analyzed. This study will provide both new insights on understanding Opa22 functions during symbiosis and technique platforms for the further researches on the protein-protein interaction network as well.

Key words *Mesorhizobium huakuii* 7653R; bacterial two-hybrid library; symbiotic nitrogen fixation; Opa22; interacting protein