

华癸中慢生根瘤菌7653R MCHK_8182 基因的共生固氮功能

路 达 彭杰丽 谢福莉 陈大松 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 根据华癸中慢生根瘤菌 7653R 全局转录组分析结果, 获得在共生固氮阶段显著上调表达的基因 MCHK_8182; 设计重叠延伸 PCR 引物, 构建 MCHK_8182 双交换突变重组质粒载体; 通过三亲本杂交, 将突变载体导入 7653R; 在蔗糖压力培养下进行筛选, 最终获得 MCHK_8182 双交换突变株。PCR 及测序验证双交换突变株构建成功。植物盆栽试验结果显示, 与 7653R 野生型接种的植株相比, MCHK_8182 突变菌株接种的植株根瘤数减少, 但固氮酶活未见明显差异。

关键词 华癸中慢生根瘤菌; 细胞色素 P450; 双交换; 突变株; 共生固氮; 共生基因 MCHK_8182; 表型
中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0056-06

植物中 CYP450 与苯丙烷(phenylpropanoid)、类黄酮(flavonoids)、萜类化合物(terpenoids)、生物碱(alkaloids)、脂类(lipids)和生氰糖苷(cyanogenic glycosides)的生物合成相关, 同时也有代谢异生型化合物的作用。大豆^[1]、野葛豆^[2-3]、紫花苜蓿^[4]中的 2-羟基异黄酮合酶(IFS), 鹰嘴豆的异黄酮 2-羟化酶和 3-羟化酶^[5]都属于细胞色素 P450 超家族。Zhang 等^[6]从蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中克隆到 2 个 FNS II (flavone synthase II) 基因 Mt-FNSII-1 和 MtFNSII-2, 两者都具有 CYP450 的羟基化活性, 并且 MtFNS II 基因被 RNA 干扰时, 蒺藜苜蓿的结瘤数下降明显。豆科植物中的 CYP450 种类较多且参与类黄酮异黄酮物质的代谢途径, 从而对根瘤菌结瘤产生影响。由于 CYP450 在植物类黄酮代谢中发挥的重要作用并且在细菌中与脂质代谢密切相关, Luyten 等^[7]对 *Rhizobium* sp. BR816 中的 CYP127A2 进行了表达分析, 并尝试用各种诱导物处理来检测 CYP127A2 的表达量, 从而预测 CYP127A2 的表达条件, 但 CYP127A2 的具体功能仍然未知。

Mesorhizobium huakuii 7653R MCHK_8182 基因长度为 774 bp, 位于 pMHb 共生质粒上, MCHK_8182 基因注释为细胞色素 P450 超家族, 其与 *Mesorhizobium australicum* WSM2073 的 Mesau_05876、*Mesorhizobium opportunistum* WSM2075 的 Mesop_6403、*Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae* WSM1271 的 Mesci_5828、*Mesorhizobium loti* MAFF303099 的 mlr5876 高度同源, 对 7653R 转录组分析的结果表明, 其在共生过程中上调表达明显(上调 202 倍)^[8], 联系到细胞色素 P450 的单加氧酶性质, 该基因有可能与共生过程中脂质分子代谢相关; 且 MCHK_8182 基因在 *nifQ* 家族蛋白基因的上游, *nifQ* 家族蛋白基因参与铁钼辅因子的初期合成。本研究利用重叠延伸 PCR 引物的方法构建双交换突变重组质粒载体, 考察其共生固氮表型, 探讨共生基因 MCHK_8182 的功能, 旨在为研究细胞色素 P450 在共生固氮中的功能及全面了解紫云英根瘤菌共生固氮机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 基本分子生物学操作

少量细菌质粒 DNA 的抽提、PCR 扩增、DNA 琼脂糖凝胶电泳、DNA 限制性内切酶酶切、T4 连接

收稿日期: 2015-06-02
基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2010CB126500); 国家自然科学基金项目(31371549); 高等学校博士点基金专项(20110146110012);
路 达, 硕士研究生, 研究方向: 根瘤菌共生固氮体系分子机理. E-mail: snowsheep2008@163.com
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

酶连接反应、普通大肠杆菌化学转化感受态的制备等操作参照文献[9]进行。

1.2 三亲本杂交

在第 1 天活化受体菌根瘤菌 7653R,第 2 天晚上活化供体菌 DH5 α -pj $q200sk8182mut$ 与辅助菌 2073。

当 3 种菌都活化到适宜浓度时,按 3 : 2 : 2 的体积比将 3 种菌液混合,2 500 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 TY 液体培养基洗涤菌体 2 次,并重悬于 50~70 μ L 的 TY 培养基中,取 4 μ L 重悬液点在 TY 无抗平板的滤膜上,正置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 1~2 d。

在已灭菌的细菌瓶中加入 5 mL 无菌水,将已培养好的滤膜放入瓶中,用移液器吹打,充分打散。以不同的稀释浓度分别涂布在 SM+Gm+Kan 抗性平板上。28 $^{\circ}$ C 培养 4~6 d,挑取单菌落进行筛选。

1.3 紫云英盆栽试验

挑选颗粒较为饱满、颜色较青的紫云英种子置于灭菌的细菌瓶中,95%乙醇浸泡 5 min 去除表面蜡质,用 10%次氯酸钠浸泡灭菌 10 min,而后用无菌水洗涤 10 次,无菌水浸泡种子 4~6 h。无菌水洗涤种子 10 次,洗涤至上清无颜色后将种子平铺在素琼脂平板上。22 $^{\circ}$ C 光照培养箱倒置培养 1~2 d。

取足量的沙子,用自来水反复洗涤至上清不浑浊后晾干,装入小塑料杯中,塑料杯由纱布条贯穿底

部,留取足够长度以便吸收水分。
向玻璃罐中加入适量无氮营养液,与装沙子的小塑料杯组合,用双层报纸封口后放入灭菌锅 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 60 min。将催芽后的种子播种到灭过菌的双层钵里,加少量无氮营养液后放置于 22 $^{\circ}$ C 光照培养箱培养。等待植株第 1 片真叶张开后接种根瘤菌。

1.4 固氮酶活测定

首先制备乙烯标准曲线。取 6 个细菌瓶,用塑胶塞密封,各注入 100 μ L 乙炔气体,然后分别注入 5、10、15、20、25、30 μ L 乙烯。将气相色谱仪设置好,用微量进样器从每个瓶中抽 100 μ L 气体注入气相色谱仪的进样室,记下乙烯峰面积,制作标准曲线。

将适量的根瘤或新鲜的样品根部放入小玻璃瓶中,用橡胶塞密封瓶口,先用注射器从瓶中抽出 1/10 体积的气体,再注入 1/10 体积的乙炔气体作为固氮酶底物,密封后置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱反应 2 h,反应完毕后用微量取样器抽取玻璃瓶内气体 100 μ L,用气相色谱仪检测乙烯吸收峰值,根据相同条件下制备的标准曲线折算乙烯体积并计算固氮酶活^[10]。

2 结果与分析

2.1 *MCHK_8182* 突变体的构建及筛选

1)突变载体的构建。根据基因组序列信息设计 SOE-PCR 的引物,如图 1 所示。在设计引物时,尽量避开上下游基因。

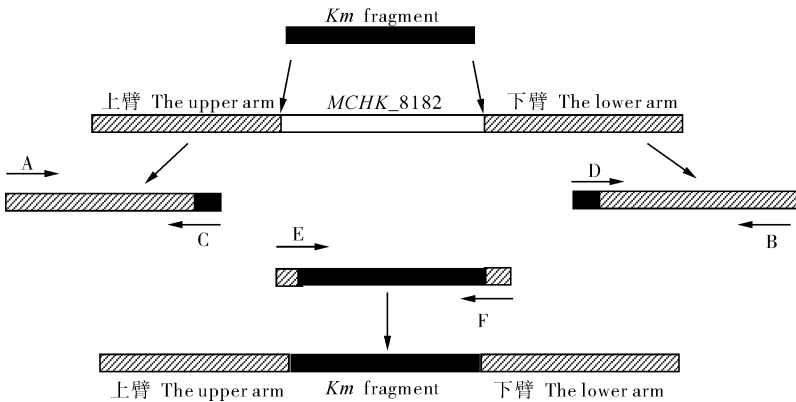
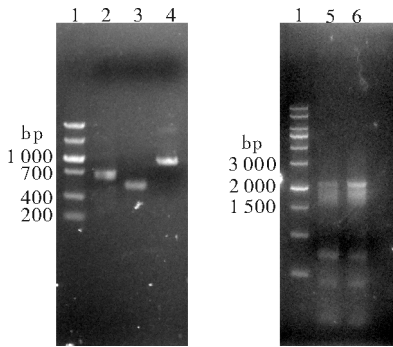


图 1 SOE-PCR 设计方案
Fig.1 Scheme of SOE-PCR

首先使用 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 基因组 DNA 为模板,以 P-A、P-C、P-B、P-D 为引物,扩增 *MCHK_8182* 的上臂下臂;以 pMD18T-Km 为模板,P-E、P-F 为引物扩增 *Km* 基因片段,上臂片

段为 698 bp,下臂片段为 521 bp,*Km* 片段为 925 bp。回收 3 种片段并以其质量比 1 : 1 : 1 为模板,用 P-A 与 P-B 作为引物进行扩增,琼脂糖凝胶电泳回收重叠延伸后的片段。



左图为 SOE-PCR 使用的模板汇总,右图分别为在 55 ℃ 与 53 ℃ 退火条件下 SOE-PCR 结果。The graph on the left shows the result of templates of SOE-PCR and the graph on the right shows the result of SOE-PCR under the annealing temperature in 55 ℃ and 53 ℃; 1.Marker; 2.上臂 The upper arm; 3.下臂 The lower arm; 4.Km; 5.SOE-1; 6.SOE-2.

图 2 SOE-PCR 片段验证

Fig.2 Fragments validation of SOE-PCR

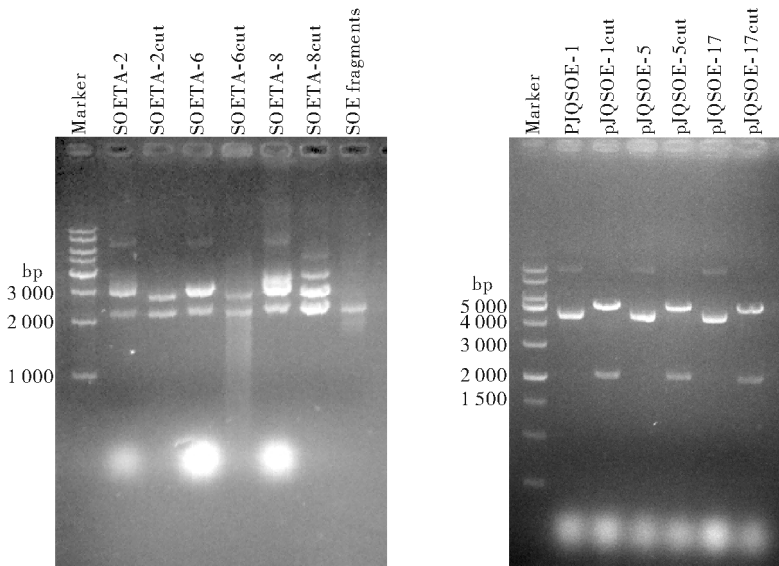


图 3 置换载体构建过程验证

Fig.3 Construction of replacement vectors

进行 PCR 验证阳性。编号为 7653RpJQ-1、7653RpJQ-2、7653RpJQ-3、7653RpJQ-4 的克隆均能得到 925 bp 的 Km 片段,证明 pJQSOE-1 已成功导入 7653R (图 4)。

2)MCHK_8182 突变体的筛选与验证。将含有 pJQSOE-1 的 7653R 活化后置于 TY+12%蔗糖培养基中培养传代,以 3 d 为单位,传代到第 8 代时,将菌液使用无菌水稀释后涂在 SM+Km+Str 平板上,28 ℃ 培养 3~4 d,分别挑取单菌落到 TY+Km+Str 与 TY+Km+Str+Gm 平板上,进行观察。若 2~3 d 之内,筛选菌在 TY+Km+Str 上生

SOE-PCR 验证过程见图 2。将融合片段克隆到 TA 克隆载体 pMD-19T 上,挑取克隆子活化后抽提质粒,酶切质粒验证并测序(图 3)。编号 SOE-TA-2、SOETA-6、SOETA-8 的克隆酶切验证正确,均能得到 2 000 bp 片段。经过测序,编号 SOETA-6 克隆所含片段正确。

根据测序结果选择正确的 TA 克隆,抽提质粒并酶切,琼脂糖凝胶电泳回收正确的融合片段,并克隆到 pJQ200sk 载体上,挑取克隆子活化后抽提质粒,酶切验证克隆阳性。编号 pJQSOE-1、pJQSOE-5、pJQSOE-17 经酶切验证正确,酶切后均能得到 2 000 bp 条带(图 3)。

以含有 pJQSOE-1 的 DH5α 为供体,含 pRK2073 的 E.coli 为辅助菌,7653R 为受体菌,通过三亲本杂交将 pJQSOE-1 载体导入到 7653R 中,挑取转化子活化后以菌液为模板,P-E、P-F为引物

长而在 TY+Km+Str+Gm 上不生长或生长很慢,那么该单菌落就有可能为双交换突变株。筛选进行传代到 25 代左右时,筛选菌株开始出现在 TY+Km+Str+Gm 生长缓慢或不生长的现象,收集双交换突变株,用 pBBR-8182 引物验证原有基因的完整性,并以菌液为模板,P-A、P-B 为引物,PCR 验证上臂上游到下臂下游的长度,并对阳性结果进行测序。

经 PCR 验证(图 5),编号 7653R-8182mut-2、7653R-8182mut-4 的菌株作为模板无法扩增出 MCHK_8182 原基因,经测序确认,编号 7653R-

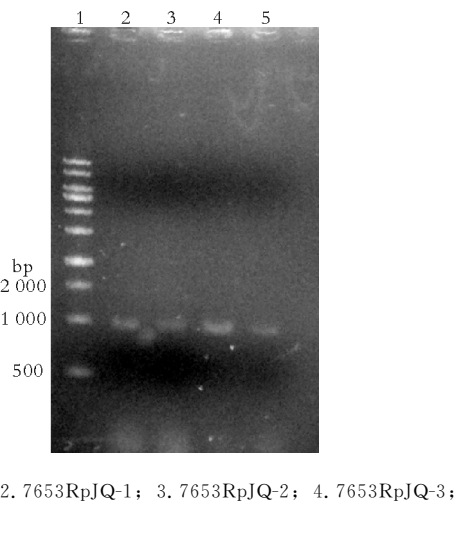


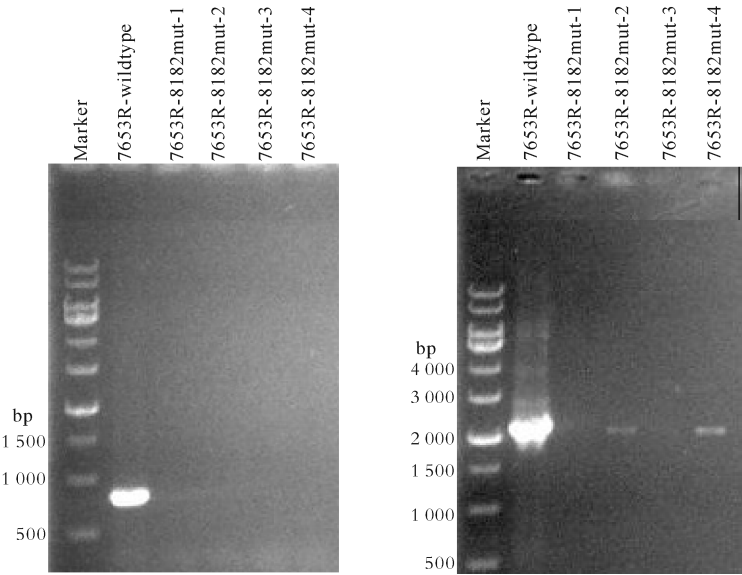
图 4 三亲本杂交验证结果

Fig.4 Validation of clone result of transformation

8182mut-2、7653R-8182mut-4 的上臂上游与下臂下游之间的片段不含有 *MCHK*_8182 原基因,被 *Km* 片段取代,双交换 *MCHK*_8182 突变菌株构建成功。

2.2 *MCHK*_8182 突变体的表型检测

分别以野生型 7653R(7653R-wildtype)与突变株(7653R-8182mut-2)为接种菌株,以不接菌为空白对照,进行紫云英盆栽试验,在 22 ℃光照培养箱培养 35 d,观察与检测植株共生表型与固氮酶活。如图 6 所示,空白对照生长正常,野生型 7653R 及 8182 突变株与空白对照存在明显差异。与野生型相比,突变株地上部分略稀疏,地上部分鲜质量没有明显差异,突变株根瘤数目少于野生型,突变型植株的根瘤较大但小瘤数量明显少于野生型,总瘤质量两者持平,固氮酶活没有明显差异(表 1)。



左图是使用 pBBR-8182 引物验证原 ORF 完整性,右图是使用 P-A、P-B 引物验证片段大小。The graph on the left shows the result of confirmation of open reading frame through pBBR-8182 primers and the graph on the right shows the confirmation of the length of exchanged fragments through P-A and P-B primers.

图 5 *MCHK*_8182 基因同源双交换突变体 PCR 验证

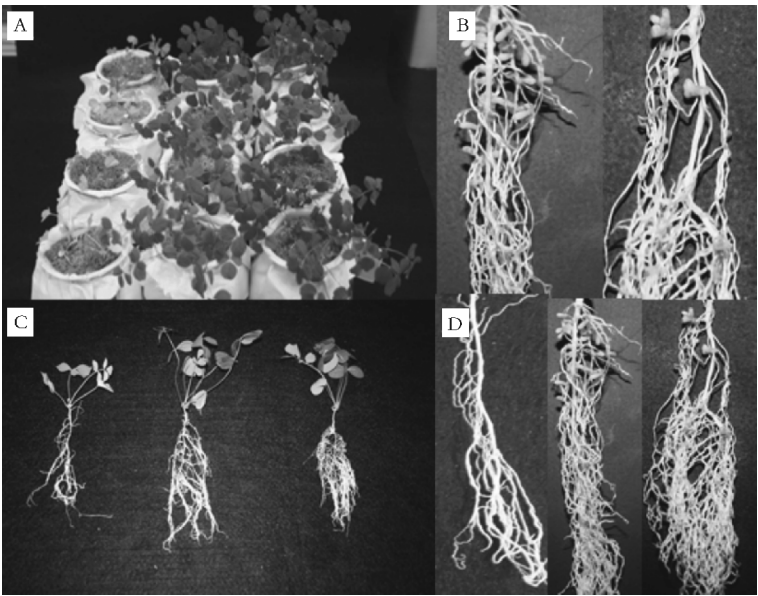
Fig.5 Identification of double-cross recombinant by PCR

表 1 *MCHK*_8182 突变体表型观测结果

Table 1 Symbiosis phenotypes induced by 7653R-8182mut-2 mutant tested on *Astragalus sinicus* L.

菌株 Strains	单株地上部鲜质量/g Aboveground parts' mass per plant	单株瘤数 The number of nodules per plant	平均瘤质量/mg The average mass of each nodule	固氮酶活/($\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$) The average of nitrogenase activity
CK	0.084 $\pm$ 0.005a	0.00	0.00	0.00
野生型 7653R 7653R-wildtype	0.363 $\pm$ 0.029b	26.5 $\pm$ 6.9b	1.67 $\pm$ 0.14b	7.78 $\pm$ 0.29b
7653R 突变株 7653R-8182mut	0.339 $\pm$ 0.092b	14.67 $\pm$ 5.8c	2.87 $\pm$ 0.50c	9.02 $\pm$ 1.12b

注：表中数据为 3 个重复的平均值,每列数据中有相同字母表示没有显著差异($P<0.05$)。The data is average of three replicate.Data in each column followed by the same letter are not significant difference ($P<0.05$).



A:由左至右分别为空白对照、野生型 7653R、7653R 突变株; B:野生型 7653R、7653R 突变株根部特写; C:植株整体图,由左至右分别为空白对照、野生型 7653R、7653R 突变株; D: 由左至右分别为空白对照、野生型 7653R、7653R 突变株的根部放大图。A:From left to right,there are blank control,7653R-wildtype,7653R-8182mut-2; B: The features of 7653R-wildtype and 7653R-8182mut-2's root; C:The graph of whole plants,from left to right,there are blank control,7653R-wildtype,7653R-8182mut-2; D: Enlarged images of plants root.From left to right,there are blank control,7653R-wildtype,7653R-8182mut-2.

图 6 *MCHK*_8182 基因同源双突变株与紫云英共生表型

Fig.6 Symbiosis phenotypes and nodulations induced by 7653R-8182mut-2 mutant tested on *Astragalus sinicus* L.

3 讨 论

笔者所在课题组前期对 *Mesorhizobium huakuii* 7653R 在共生过程中的基因表达使用 RNA-Seq 与 Microarrays 进行分析,发现 *MCHK*_8182 基因在类菌体中上调表达并且上调表达量居于前 25 位^[8]。本研究通过蔗糖压力筛选,获得了 *Mesorhizobium huakuii* 7653R *MCHK*_8182 双交换突变菌株,并通过盆栽试验观测了突变体的表型。与野生型的 7653R 相比,*MCHK*_8182 突变体的地上表型差异并不明显,但根部差异明显,*MCHK*_8182 突变体的根瘤明显少于野生型 7653R 且小根瘤减少明显。

CYP450 作为一类单加氧酶,其功能主要集中在内生物质的修饰与外源物质的代谢方面^[11-14]。关于 CYP450 在根瘤菌中的表达,Tully 等^[11]的研究表明 *Bradyrhizobium japonicum* 中的 CYP112 和 CYP114 在共生条件下表达而在自生状态下不表达,笔者所在课题组前期的研究^[8]也证实 *MCHK*_8182 与共生固氮过程相关,并且受到固氮相关因素调控。Luyten 等^[7]对 *Rhizobium* sp.BR816 中的 CYP127A2 做过相应的研究,在 *nifH* 突变的 *Rhi-*

zobium sp.BR816 中检测 CYP127A2 的表达,发现其表达基本不受影响,*nifH* 突变对 *Rhizobium* sp. BR816 的结瘤能力没有影响但根瘤没有固氮活性,说明 CYP127A2 的底物并不是固氮相关的代谢物。Luyten 等^[7]在模拟条件下使用多种诱导物处理 *Rhizobium* sp.BR816 并检测 CYP127A2 的表达水平,采用黄酮黄烷酮类化合物、香草醛、葫芦巴碱、香豆素作为诱导物诱导 CYP127A2,并不能有效地诱导 CYP127A2 表达;加入短链醇类物质时,CYP127A2 上调表达明显。本研究中紫云英盆栽试验结果显示,*MCHK*_8182 突变体的根瘤明显少于野生型 7653R,说明 *MCHK*_8182 的突变影响到根瘤菌结瘤的过程;突变株固氮酶活性没有明显变化,说明 *MCHK*_8182 没有参与固氮酶相关的代谢过程。因此,我们推测:一方面 *MCHK*_8182 可能参与某种植物根系的脂质代谢,而该物质的积累不利于根瘤的发生;另一方面 *MCHK*_8182 可能是结瘤因子修饰中的一环,直接或间接参与结瘤因子修饰。

参 考 文 献

[1] KOCHS G,GRISEBACH H.Enzymic synthesis of isoflavones [J].J Biochem,1986,155: 311-318.

[2] HAKAMATSUKA T, HASHIM M F, EBIZUKA Y, et al. P-450-dependent oxidative rearrangement in isoflavone biosynthesis: reconstitution of P-450 and NADPH: P-450 reductase [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47: 5969-5978.

[3] HASHIM M F, HAKAMATSUKA T, EBIZUKA Y, et al. Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis[J]. *FEBS*, 1990, 271(1/2): 219-222.

[4] KESSMANN H, CHOUDHARY A D, DIXON R A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts [J]. *Plant cell*, 1990, 9: 38-41.

[5] HINDERER W, FLETJE U, BARZ W. Microsomal isoflavone 2'- and 3-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpan phytoalexin formation[J]. *FEBS*, 1987, 214(1): 101-106.

[6] ZHANG J, SUBRAMANIAN S, ZHANG Y, et al. Flavone synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation[J]. *Plant physiology*, 2007, 144: 741-751.

[7] LUYTEN E, SWINNEN E, VLASSAK K, et al. Analysis of a symbiosis-specific cytochrome P450 homolog in *Rhizobium* sp. BR816[J]. *MPMI*, 2001, 14: 918-924.

[8] PENG J, HAO B, LIU L, et al. RNA-Seq and microarrays analyses reveal global differential transcriptomes of *Mesorhizobium huakuii* 7653R between bacteroids and free-living cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93626.

[9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南版[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 26-400.

[10] HARDY R W F, BURNS R C, HOLSTEN R D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation[J]. *Soil Bid Biorhem*, 1973, 5: 47-81.

[11] TULLY R E, KEISTER D L. Cloning and mutagenesis of a cytochrome P-450 locus from *Bradyrhizobium japonicum* that is expressed anaerobically and symbiotically[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1993, 59(12): 4136-4142.

[12] PEDRINI N, ZHANG S, JUAREZ M P, et al. Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. *Microbiology*, 2010, 156: 2549-2557.

[13] ROBERTS G A, GROGAN G, GRETER A, et al. Identification of a new class of cytochrome P450 from *Rhodococcus* sp. [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184: 3898-3908.

[14] WEN L P, FULCO A J. Cloning of the gene encoding a catalytically self-sufficient cytochrome P450 fatty-acid monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* and its functional expression and regulation in heterologous (*Escherichia coli*) and homologous (*Bacillus megaterium*) hosts[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 6676-6682.

Symbiotic nitrogen fixation function of *MCHK*_8182 in *Mesorhizobium huakuii* 7653R

LU Da PENG Jieli XIE Fuli CHEN Dasong LI Youguo

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

Abstract Based on analyzing the transcriptome of *Mesorhizobium huakuii* 7653R, *MCHK*_8182 was identified to be up-regulated significantly during the stage of symbiotic nitrogen fixation. SOE-PCR primers were designed and an *MCHK*_8182 replacement vector was constructed. Through three parental matting, the replacement vector was introduced into *M. huakuii* 7653R. The transconjugants were screened under a pressure of sucrose culture. The *MCHK*_8182 replacement mutant was finally obtained and its correctness was confirmed by PCR and sequencing. The result of the pot experiment showed that the phenotype of host plants induced by *MCHK*_8182 mut had a remarkably reduced number of root nodules compared with wild-type 7653R, but nodules nitrogenase activity remained unchanged.

Keywords *Mesorhizobium huakuii*; cytochrome P450 (CYP450); double exchange; mutant strains; symbiotic nitrogen fixation; symbiotic gene *MCHK*_8182; phenotype