

百脉根根瘤菌 *nod-lacZ* 转录融合子 构建及表达分析

裴俊清 段柳剑 张忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 根据 *Mesorhizobium loti* 基因组信息, 克隆 *nodA*、*nodB*、*nodD* 等基因的启动子序列, 分别与报告基因构建相应的转录融合子(*nod-lacZ*), 并分别导入中慢生型百脉根根瘤菌 MAFF303099 和广谱根瘤菌 NGR234 (*Rhizobium* sp.) 中, 利用百脉根根的抽提物作为诱导物, 检测结瘤基因的表达。结果表明: 在 MAFF303099 菌株中, 百脉根根抽提物不能诱导 *nodA* 的表达; 能诱导 *nodB* 和 *nodD1* 的表达; *nodD2* 呈组成型表达; 供试的 5 种不同的类黄酮化合物都不能诱导 *nodA* 基因表达; 在 NGR234 菌株中, 毛地黄酮(Luteolin)能诱导 *nodA* 表达。

关键词 百脉根根瘤菌; 结瘤基因; 根抽提物; *nod-lacZ* 转录融合子

中图分类号 S 182; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)02-0001-08

根瘤菌能特异地与豆科植物形成共生体-根瘤, 根瘤的发生、发展和形成过程是微生物与植物相互识别、信号分子间相互作用的结果^[1-3]。根瘤菌在有宿主植物分泌的类黄酮化合物信号分子条件下, 启动结瘤基因的表达并合成结瘤因子。结瘤因子作为根瘤菌共生信号分子作用于寄主植物, 引起植物细胞一系列形态、生理生化变化直至根瘤器官的形成^[4-5]。除了类黄酮化合物以外, 甜菜碱(betaines)、赤酮酸(erythronic)和季酮酸(tetronic acid)等化合物也能作为结瘤基因的诱导物^[6]。根瘤菌的结瘤基因分为三类: 调节基因(*nodD*)、共同结瘤基因(*nod-ABCIJ*)和宿主专一性基因(如 *nodFEGPQ*, *nodH*)。在根瘤菌中, *nodD* 是一类调节基因, 通常位于 *nodABC* 的上游, 但转录方向与 *nodABC* 相反。该基因的产物 NodD 蛋白属于 lysR 类转录调控因子(LRRTs)^[7], 被类黄酮化合物激活后通过结合到 *nod* 基因的上游结瘤盒(*nod box*)上调 *nod* 基因的表达。不同的根瘤菌中 *nodD* 基因的拷贝数有所不同, 调控共同结瘤基因表达的机制也十分复杂, 如苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)中存在多个 *nodD* 基因, 分别受不同类黄酮化合物诱导;

而广谱根瘤菌(*Rhizobium* sp.) NGR234 中的 *nodD1* 基因, 却可以同时受多种类黄酮化合物诱导, 与多种宿主植物共生结瘤^[8]。此外, 有些根瘤菌的 NodD 蛋白除了能调控其他 *nod* 基因转录之外, 还能调控自身表达。

百脉根是重要的模式豆科植物之一, 在共生固氮基础研究领域占有重要地位。然而与百脉根共生的中慢生型根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)结瘤基因诱导表达机制仍不清楚。在 *M. loti* MAFF303099 菌株中大部分结瘤基因位于染色体的共生岛上, 预测 *nodA* 和 *nodB* 上游各有一个保守的结瘤盒(*nod box*)序列^[9], *nodAC* 属于一个转录单元, *nodB* 则存在于另一转录单元。2 个调节基因 *nodD1* 和 *nodD2* 都位于 *nodB* 的下游, *nodD1* 与 *nodB* 的转录方向相反, 而 *nodD2* 与 *nodB* 的转录方向相同。为了揭示 *M. loti* 结瘤基因表达调控机制, 本研究利用 *lacZ* 报告基因, 构建不同的转录融合子导入宿主菌中, 通过百脉根根抽提物及 5 种不同的类黄酮化合物处理, 检测 *M. loti* 结瘤基因表达, 旨在为分离和鉴定中慢生型百脉根根瘤菌 *nod* 基因诱导物

收稿日期: 2017-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670240)

裴俊清, 硕士研究生, 研究方向: 根瘤菌分子生物学. E-mail: wenming520761@126.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮. E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

百脉根 (*Lotus japonicus*) MG20 种子、常规的克隆载体、大肠杆菌菌株以及根瘤菌 MAFF303099、NGR234 等均为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室所保藏。DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max Premix (2×) 购自 TaKaRa (大连) 公司, 四环素、X-gal、ONPG、实验所用类黄酮化合物等均购自 Sigma 公司。

1.2 植物材料准备

用浓 H₂SO₄ 处理百脉根 MG20 种子 8~15 min 后, 将 H₂SO₄ 吸出; 无菌水洗 4~5 次; 加入 2% 次氯酸钠溶液消毒 3~10 min; 用无菌水洗 6~7 次; 留部分水浸没种子; 4℃ 低温黑暗处理 24 h; 将吸胀的

种子移至 MS 平板中, 22℃ 培养箱暗培养 1~2 d, 光照培养 2~3 d; 转移到蛭石和珍珠岩中培养, 用无氮营养液浇灌幼苗。

1.3 载体构建

根据 *nodA*、*nodB*、*nodD1*、*nodD2* 基因的启动子 (*nodpro*) 序列, 设计并合成引物 (表 1)。本研究所用载体为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室改造后的 pHC601 载体, 即用 *lacZ* 报告基因取代 pHC60 载体上的 *GFP* 基因及其上游的 T7 启动子。通过 Gibson 等^[10] 的方法将扩增得到的 *nodpro* 片段连接到 pHC601 载体上, 构建 *nod-lacZ* 转录融合子。反应体系 10 μL, 包括 5 μL Gibson 反应液以及等物质的量的载体和片段, 反应条件为 50℃ 反应 60 min。转化 8 μL Gibson 反应体系到大肠杆菌感受态细胞中, 进行菌落 PCR 并测序验证重组载体的正确性。

表 1 *nodpro* 克隆引物
Table 1 Primers for *nodpro* clone

启动子 Promoter	长度/bp Length	上游引物 F-Primer(5'-3')	下游引物 R-Primer(5'-3')
<i>nodApro</i>	1 180	TTCGAGCTCGGTACCTAAAACACTGG-GAGACACTGTG	GGATCCCCGGGTACCGGGTCTAT-GAACGGCCCTCC
<i>nodBpro</i>	512	TTCGAGCTCGGTACCGACGCTGACG-GTTCCGC	GGATCCCCGGGTACCAGCTGCGAAC-CCTTGCG
<i>nodD1pro</i>	946	TTCGAGCTCGGTACCCGCTCACCGA-CACCTTG	GGATCCCCGGGTACCGGCTTTCACT-TATCCATAGC
<i>nodD2pro</i>	1 001	TTCGAGCTCGGTACCTTCCCAT-GAAGAGTTTAACTGATAC	GGATCCCCGGGTACCGCCTCATCT-GTCCGTAACGTG

1.4 根瘤菌感受态的制备及电转化

参照王北艳等^[11] 苜蓿中华根瘤菌感受态制备方法, 并加以改进: 电转化缓冲液为用超纯水配制的 10% 甘油和 0.5 mmol/L 蔗糖溶液; 28℃、200 r/min 培养至 *D*₆₀₀ 达到 0.4~0.5; 每升培养物以 1 mL 预冷电转化缓冲液重悬, 每管 40 μL 分装后液氮速冻 3 min, 于 -80℃ 冰箱保存。

1.5 百脉根根粗提物的制备

取生长 2 周的百脉根的根 1 g, 研磨后加入 10 mL 80% 甲醇, 4℃ 旋转 18 h, 1 000 r/min 离心 2 min, 将上清分装入新的离心管中, 35℃ 真空抽干, 加 1 mL H₂O 重悬, 过滤除菌后储存于 -20℃ 冰箱中备用。本研究中, 每 1.4 mL 诱导混合物中加入了 80 μL 百脉根根的粗提物 (root extract, RE)。

1.6 β-半乳糖苷酶活性测定方法

根瘤菌接种于 TY (含 10 μg/mL 四环素) 液体培养基中培养约 48 h; 记录收集细胞时的 *D*₆₀₀, 并用含四环素的 TY 稀释 *D*₆₀₀ 至 0.1; 配制诱导混合物 (含 400 μL 稀释后的菌液、1 mL 无菌水、适量类黄酮诱导物); 于 28℃、200 r/min 诱导培养; 记录诱导后混合物的 *D*₆₀₀; 取 400 μL 诱导后的培养物于新的离心管中 (2 个重复); 加入 20 μL 氯仿和 50 μL 0.1% SDS, 涡旋混匀; 30℃ 水浴 5 min; 在一个新的离心管中加入 800 μL Z buffer 做为空白对照; 在反应管和空白对照管中分别迅速加入 160 μL ONPG 贮备液并开始计时, 将所有离心管置于 30℃ 水浴孵育; 当反应液颜色变黄时, 加入 0.4 mL 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应, 并记录所用时间; 用酶标仪检测

D_{420} 和 D_{550} 的值,计算 β -半乳糖苷酶活性^[12]。

2 结果与分析

2.1 MAFF303099 结瘤基因启动子上的结瘤盒分析

广谱根瘤菌 NGR234 中有 19 个结瘤盒,它们都有一段共有序列^[13]。为了寻找 *M. loti* MAFF303099 的结瘤盒序列,以根瘤菌 NGR234 结

瘤盒的共有序列为模板,分别将 MAFF303099 的 *nodA*、*nodB*、*nodC*、*nodD1*、*nodD2* 的启动子序列与模板序列比对,结果如表 2 所示,在 *nodA*、*nodB*、*nodD1* 的上游各找到了 1 个结瘤盒序列,未在 *nodC* 和 *nodD2* 的上游找到结瘤盒序列。因此,分别克隆了共同结瘤基因 *nodA*、*nodB* 以及调节基因 *nodD1*、*nodD2* 的启动子序列用于后续的研究。

表 2 MAFF303099 结瘤基因启动子上的结瘤盒序列
Table 2 Predicted *nod* boxes identified in MAFF303099 *nod* gene promoters

基因 Gene	基因座标签 Locus tag	结瘤盒序列 <i>nod</i> box sequence	位置 ¹⁾ Location	错配数 Mismatch
<i>nodA</i>	MAFF_RS25210	CATCCATAGCGTGGATGCTCGCGATCTA- AACAATCAATTTTACCAATCC	−81~−22	1
<i>nodD1</i>	MAFF_RS25265	TATCCATAGCGTGGATGCTCGCGATCTA- AACAATCGATTTTACCAAAC	−59~−11	1
<i>nodB</i>	MAFF_RS25245	TATCCGCAACGTGGATGCTTGT- CATCGAAACAATCGATTTTGCCGATTG	−338~−290	6
Consensus in NGR234		YATCCAYNNYRYRGATGNNNNYNATC- NAAACAATCRATTTTACCAATCY		0

注:根瘤菌 NGR234 的结瘤盒共有序列参照文献[10];R 代表碱基 A 或 G;Y 代表碱基 U、T 或 C;N 代表任何一种碱基;1): 结瘤盒的位置以结瘤基因为参照。Note: The *nod* box consensus sequence in NGR234 shown in reference literature [10]; R for either A or G; Y replacing U, T, or C; N is for any base. 1): The location indicatses distance from the corresponding *nod* gene.

2.2 *nod-lacZ* 转录融合子构建

根据 MAFF303099 菌株基因组提供的 *nodA*、*nodB*、*nodD1*、*nodD2* 基因信息,鉴定出各基因的启动子序列并设计引物。以 *M. loti* MAFF303099 菌株的总 DNA 为模板,PCR 扩增得到各个基因的启动子序列, *nodApro*、*nodBpro*、*nodD1pro*、*nodD2pro* 等 4 个启动子的长度分别为 1 180、512、946、1 001 bp(图 1A)。利用 Gibson 一步法克隆技术,分别将结瘤基因启动子连接到 pHC601 载体上 *Kpn* I 酶切位点(图 1B),构建不同的 *nod-lacZ* 转录融合载体。将这些载体分别转入大肠杆菌 DH10B 中扩增,所克隆片段经 PCR 验证及测序正确后,通过电转化将这些转录融合载体分别导入中慢生型根瘤菌 MAFF303099 和广谱根瘤菌 NGR234 菌株中,在含有四环素的根瘤菌培养基(TY)上筛选转化子。

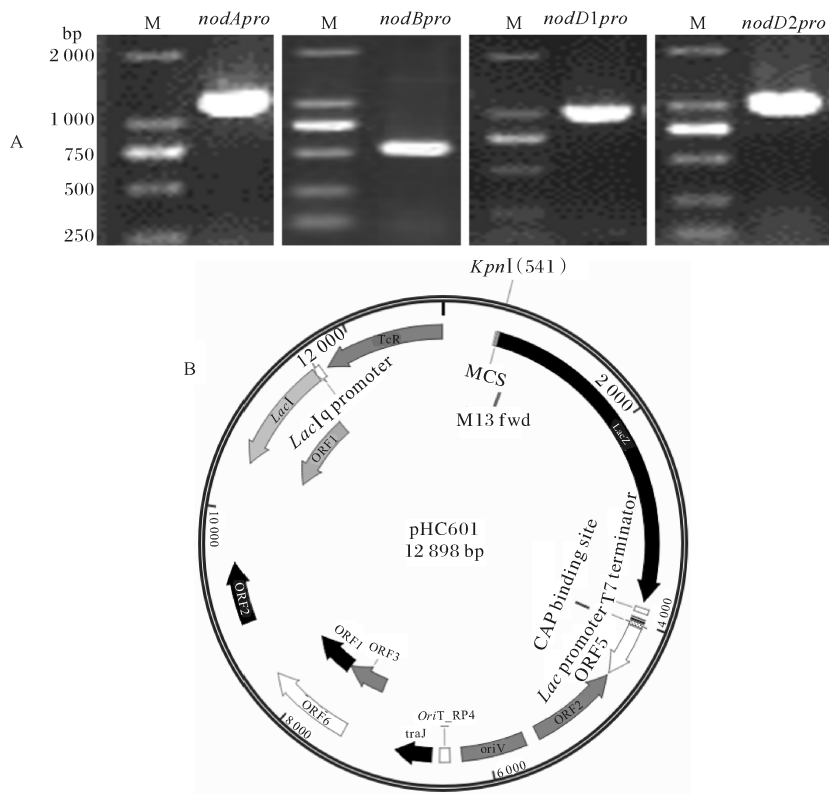
2.3 百脉根 RE 诱导 *nod-lacZ* 转录融合子表达

用百脉根 RE 分别诱导含有 *nod-lacZ* 融合子的 *M. loti* MAFF303099 菌株,取 1.5 μ L(D_{600} =

0.1)菌液接种到含有 X-Gal 的 TY 平板上培养 24 h,观察菌落颜色。结果显示,含 *nodB-lacZ* 和 *nodD1-lacZ* 的根瘤菌经 RE 处理后的菌落颜色变蓝,*nodD2-lacZ* 在加或不加 RE 时菌落都变蓝,含 *nodA-lacZ* 的重组菌株在加或不加诱导物 RE 的情况下,始终不变蓝(图 2)。这表明,*nodB* 和 *nodD1* 的转录融合子能被 RE 诱导表达;*nodA* 的转录融合子不能被 RE 诱导表达;*nodD2* 的转录融合子表达不依赖于诱导物 RE,呈组成型表达。

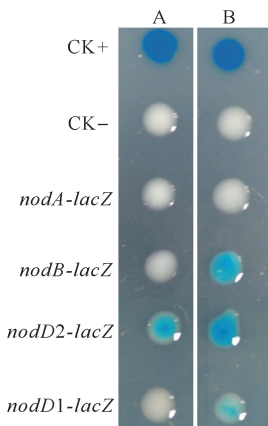
2.4 百脉根 RE 诱导时间对 *nod-lacZ* 表达的影响

为了探究不同诱导时间下,RE 对各个 *nod-lacZ* 的诱导情况并寻找 RE 的最佳诱导时间(由于 *nodA-lacZ* 在 X-Gal 平板上没有变蓝,因此没有检测该融合子),分别在不同的诱导时间点取样,测定 β -半乳糖苷酶活并绘制诱导时间曲线(图 3)。结果显示,前 8 h,*nodB-lacZ*、*nodD1-lacZ* 和 *nodD2-lacZ* 的表达水平保持不变并与对照组无差别,之后随着诱导时间的增加而增加;诱导 22 h 后均为本底酶活水平的 2~3 倍。



A: *nodA*、*nodB*、*nodD1* 和 *nodD2* 启动子 PCR 扩增产物胶图; B: pHc601 质粒图谱; M: DNA 分子质量标准; 灰色三角代表 *nod* 启动子的插入位点。A: PCR products of *nodA* promoter, *nodB* promoter, *nodD1* promoter and *nodD2* promoter respectively; B: Map of pHc601. M: DNA Marker; Grey triangle: The insertion site of *nod* promoter.

图 1 pHc601-*nod-lacZ* 重组表达载体构建
Fig.1 Construction of pHc601-*nod-lacZ* plasmid

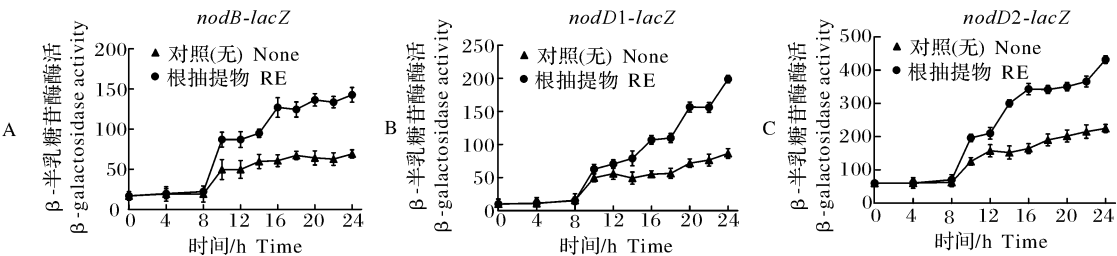


CK+: 组成型表达 *lacZ* 的 *M. loti* NZP2235; CK-: 为野生型 *M. loti* MAFF303099; A: 水处理组; B: RE 处理组。CK+: *M. loti* NZP2235 constitutive expression of *lacZ*; CK-: Wild type *M. loti* MAFF303099; A: Water treatment; B: RE treatment.

图 2 *nod-lacZ* 转录融合子在 *M. loti* MAFF303099 中的表达
Fig.2 Expression of *nod-lacZ* fusions in *M. loti* MAFF303099

2.5 诱导后根瘤菌浓度对 β -半乳糖苷酶酶活测定的影响

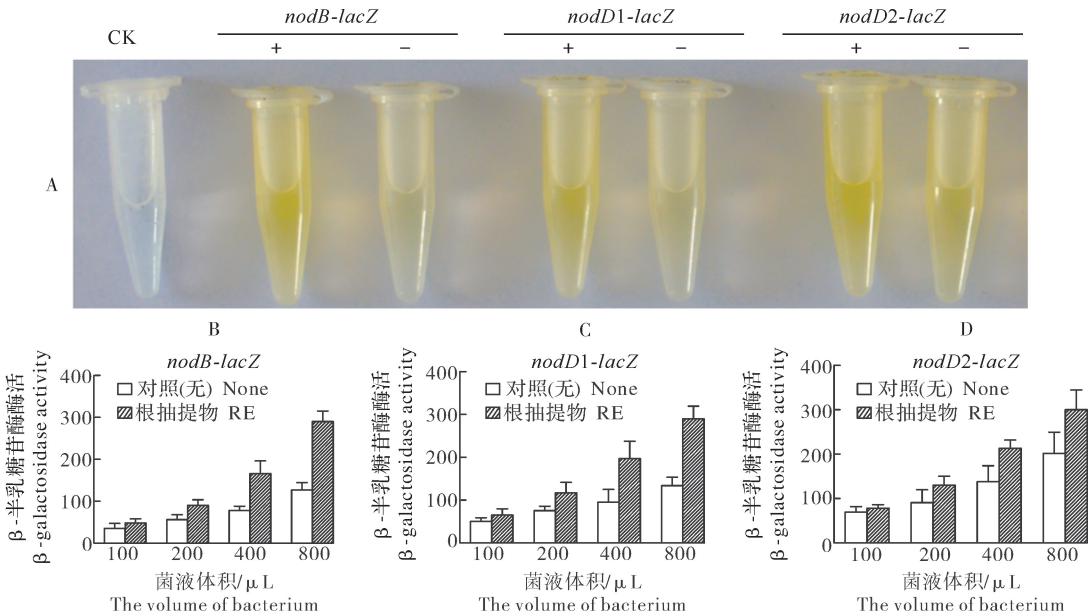
为了优化根瘤菌 *nod-lacZ* 表达量测定方案,在测定 β -半乳糖苷酶活性的反应体系中分别加入 100、200、400、800 μ L 诱导后的菌液,以 ONPG 为底物,观察颜色差异和测定酶活。结果显示,除了 *nodD2-lacZ* 以外,*nodB-lacZ* 以及 *nodD1-lacZ* 百脉根 RE 处理组的颜色明显深于水处理组的颜色, *nodD2-lacZ* 处理组的颜色与未处理组差异不大(图 4A);通过测定 β -半乳糖苷酶的活性,定量分析了各个 *nod-lacZ* 融合子在 *M. loti* MAFF303099 中的表达情况,结果显示:当重组菌株的菌液量达到 400 μ L 后, *nodB-lacZ* 以及 *nodD1-lacZ* 的 RE 处理组的酶活上调了 2~3 倍,而 *nodD2-lacZ* 的 RE 处理组的酶活上调不到 2 倍(图 4B-D)。



A-C: 分别表示不同诱导时间下, *nodB-lacZ*, *nodD1-lacZ* 和 *nodD2-lacZ* 的 β -半乳糖苷酶活。 A-C: The β -galactosidase activities of *nodB-lacZ*, *nodD1-lacZ* and *nodD2-lacZ* fusions respectively.

图 3 诱导时间对 *nod-lacZ* β -半乳糖苷酶活的影响

Fig.3 The effects of induction time on β -galactosidase activities of *nod-lacZ* fusions



A: 终止反应后的反应液颜色; +: RE 处理组; -: 水处理组; B-D: 受 RE 诱导后, 不同浓度的重组根瘤菌的 β -半乳糖苷酶活。 A: Color of the reaction liquid after terminated the reaction. +: RE treatment; -: Water treatment; B-D: The β -galactosidase activities after reaction with different concentration of bacterium culture.

图 4 菌液浓度对 *nod-lacZ* 的 β -半乳糖苷酶活的影响

Fig.4 The effects of concentration of bacterium culture on β -galactosidase activities of *nod-lacZ*

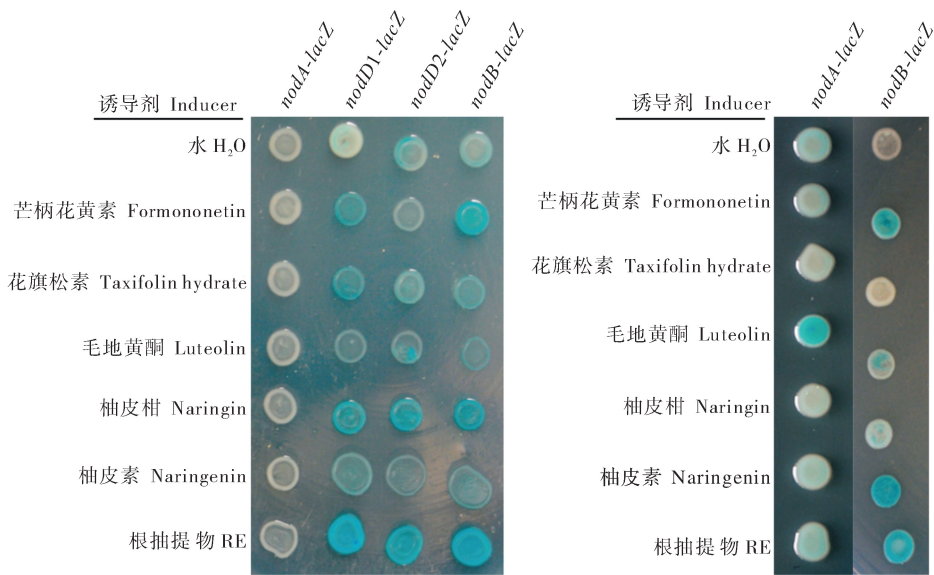
2.6 类黄酮化合物诱导 *nod-lacZ* 转录融合子的表达分析

为了鉴定诱导 MAFF303099 结瘤基因表达 的类黄酮化合物,检测了芒柄花黄素 (Formononetin)、花旗松素 (Taxifolin hydrate)、毛地黄酮 (Luteolin)、柚皮苷 (Naringin)、柚皮素 (Naringenin)等 5 种商购的类黄酮化合物诱导 *nod-lacZ* 转录融合子的表达情况。结果显示:在 *M. loti* MAFF303099 菌株中,供试的 5 种类黄酮化合物都不能诱导 *nodA-lacZ* 的表达;Formononetin 和 Naringin 分别能诱导 *nodB-lacZ* 的表达,而 *nodD1-lacZ*

和 *nodD2-lacZ* 的只能被 Naringin 诱导(图 5A)。在 *Rhizobium* sp. NGR234 中,Formononetin 和 Naringenin 分别能诱导 *nodB-lacZ* 的表达,Luteolin 能诱导 *nodA-lacZ* 表达(图 5B)。

3 讨论

不同的根瘤菌中 *nodD* 基因拷贝数有所不同,同一种根瘤菌中不同的 *nodD* 基因的表达调控模式和功能也存在很大差异。*M. loti* MAFF303099 结瘤基因 *nodA*、*nodB* 和 *nodD1* 的上游分别有 1 个保守的结瘤盒序列,推测它们的表达可能受到 NodD



A: *M. loti* MAFF303099 中 *nod-lacZ* 转录融合子在含有 X-Gal 的 TY 平板上的表达情况; B: NGR224 中 *nod-lacZ* 转录融合子在含有 X-Gal 的 TY 平板上的表达情况。A: Expression of *lacZ* in MAFF303099 with *nod-lacZ* on TY plate containing both X-Gal and tetracycline. B: Expression of *lacZ* in NGR224 with *nod-lacZ* on TY plate containing both X-Gal and tetracycline.

图 5 类黄酮诱导 *nod-lacZ* 转录融合子的表达情况

Fig.5 The expression of *nod-lacZ* fusions after treated by different flavonoids

调控蛋白的调控。本研究通过 X-Gal 平板实验发现 *nodD2-lacZ* 在不受 RE 诱导的情况下也能表达;而 *nodB-lacZ* 和 *nodD1-lacZ* 在 RE 处理后才能够表达。根据以上结果推测,调控基因 *nodD2* 在 *M. loti* MAFF303099 中呈组成型表达,而 *nodD1* 的表达可能受到 NodD2 或其他调控蛋白的调控,这种 NodD 蛋白调控自身表达以及 NodD 之间的互相调控的情况在许多根瘤菌中都有报道^[14-15];共同结瘤基因 *nodB* 的表达受“NodD-类黄酮”复合物的调控。*nodA* 基因的上游也有一个保守的结瘤盒,在 *M. loti* MAFF303099 中却不被 RE 诱导表达,其原因可能是根中其他类黄酮化合物或非类黄酮化合物的调控,而本研究所提取的类黄酮粗提物中是否含有此种化合物还有待深入分析。

通过定量分析发现,*nodB-lacZ*、*nodD1-lacZ*、*nodD2-lacZ* 的 β-半乳糖苷酶酶活都能被 RE 诱导上调;但 *nodB-lacZ* 和 *nodD1-lacZ* 的 β-半乳糖苷酶酶活始终只上调 2~3 倍;*nodD2-lacZ* 受 RE 诱导后的酶活也有一定的上调。根据以上结果推测, NodD2 蛋白不仅能激活其他 *nod* 基因表达还能调控自身表达,但是 NodD2 和 NodD1 的调控效率可

能不高,因此导致 *nodB* 基因上调不明显。有研究表明,苜蓿中华根瘤菌(*S. meliloti*)*NodD1* 对自身 *nod* 基因的转录调控水平仅为其他根瘤菌 NodD 的 25%^[16]。

nod box 是位于 *nod* 基因启动子区的一段 DNA 序列,含有 2 个保守的 ATC-N₉-GAT 回文序列,该回文序列是 NodD 调控蛋白的特异性结合位点。有研究表明,*nod box* 序列对 *nod* 基因启动子活性有极大影响,当 *nod* 基因上游的 *nod box* 5'或 3'的保守核苷酸序列缺失突变后,该 *nod* 基因的转录受阻;当 *nod box* 中的个别核苷酸突变后,该 *nod* 基因的启动子活性或(和)“NodD-类黄酮”复合物与 *nod box* 结合效率发生相应改变^[17]。可见,*nod* 基因启动子区的 *nod box* 也是调控 *nod* 基因转录的一个重要因素,本研究中共同结瘤基因 *nodA* 和 *nodB* 上游各有一个 *nod box*,虽然 2 个 *nod box* 的保守序列与其他种属根瘤菌较为一致,但其不保守序列却存在较大差异(图 6),这些差异也可能影响启动子活性以及“NodD-类黄酮”复合物与 *nod box* 结合效率。

<i>R. leg</i>	T	ATC	CATTCCATA	GAT	GATTGCC	ATC	CAAACAATC	AAT	TTTACCAATCT
<i>R. tri</i>	G	ATC	CACGCTGTA	GAT	GAITGCG	ATC	CAAACAATC	AAT	TTTACCAATCT
<i>S. mel</i>	C	ATC	CATATCGCA	GAT	GATCGTT	ATC	CAAACAATC	AAT	TTTACCAATCT
<i>B. jap</i>	T	ATC	CATCGTGTG	GAT	GTGTTCT	ATC	GAAACAATC	GAT	TTTACCAAAC
<i>M. loti nodA</i>	C	ATC	CATAGCGTG	GAT	GCTCGCG	ATC	TAAACAATC	AAT	TTTACCAATCC
<i>M. Loti nodB</i>	T	ATC	CGCAACGTG	GAT	GCTTGTC	ATC	GAAACAATC	GAT	TTTGCCGATTG
Consensus	Y	ATC	CAYNNYR	GAT	GNNNNYN	ATC	NAAACAATC	RAT	TTTACCAATCY

R. leg: 豌豆根瘤菌变种 *viciae*; *R. tri*: 豌豆根瘤菌变种 *trifolii*; *S. mel* 苜蓿中华根瘤菌; *B. jap*: 慢生型大豆根瘤菌; *M. loti*: 中慢生型百脉根根瘤菌 MAFF303099。粗体表示 ATC-N₉-GAT 回文序列。R 代表碱基 A 或 G; Y 表示碱基 U、T 或 C; N 代表任意碱基。*R. leg*、*R. tri*、*S. mel* 以及 *B. jap* 几种根瘤菌的结瘤盒序列见参考文献[18]。*R. leg*: *R. leguminosarum* bv. *viciae*; *R. tri*: *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; *S. mel*: *S. meliloti*; *B. jap*: *B. japonicum*; *M. loti*: *M. loti* MAFF303099。The ATC-N₉-GAT repeats are indicated in boldface type. R for either A or G; Y replacing U, T, or C; N is for any base. The *nod* box sequences of *R. leg*, *R. tri*, *S. mel* and *B. jap* shown in reference literature [18].

图 6 根瘤菌共同结瘤基因结瘤盒序列比较

Fig.6 Sequence comparison of different *nod* boxes upstream from the common *nod* gene operons

不同的“NodD-类黄酮”复合物，能结合不同的 *nod* box，并且诱导 *nod* 基因表达的效率也不同^[19]。Luteolin 和 Naringenin 是激活广谱根瘤菌 NGR234 中 NodD1 蛋白的 2 种诱导物，能分别使 NGR234 自身 *nod* 基因表达上调 6 倍和 15 倍^[14]。本研究中，由于广谱根瘤菌 NGR234 中的 *nod* 基因调控网络与 *M. loti* MAFF303099 中的不同，因此，导致了 *nodA-lacZ*、*nodB-lacZ* 在广谱根瘤菌 NGR234 中被诱导的情况与在 *M. loti* MAFF303099 中有所不同。

参 考 文 献

[1] 李碧璇,张晴,朱辉,等.百脉根小 GTPase ROPs 基因反转座子插入突变体的分离和鉴定[J].华中农业大学学报,2017,36(2):45-52.

[2] 叶竞阳,王建云,熊小波,等.紫云英类受体蛋白激酶 Nip43 靶蛋白的筛选与初步鉴定[J].华中农业大学学报,2016,35(3):49-53.

[3] 杨倩倩,刘元,陈大松,等.蒺藜苜蓿中 1 个聚半乳糖醛酸酶基因突变体的筛选及共生固氮表型的初步鉴定[J].华中农业大学学报,2017,36(4):62-70.

[4] LEROUGE P, ROCHE P, FAUCHER C, et al. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal[J]. Nature, 1990,344(6268): 781-784.

[5] 黄蓓,周思瑜,李荣,等.百脉根小 GTPase 激活蛋白的鉴定及突变体分离[J].华中农业大学学报,2017,36(2):53-58.

[6] PERRET X, STAEHELIN C, BROUGHTON W J. Molecular basis of symbiotic promiscuity[J]. Mol Biol Rev,2000,64:180-201.

[7] MADDOCKS S E, OYSTON P C F. Structure and function of

the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins[J].Microbiology,2008,154:3609-3623.

[8] SUOMINEN L, LUUKKAINEN R, ROOS C, et al. Activation of the *nodA* promoter by the *nodD* genes of *Rhizobium galegae* induced by synthetic flavonoids or *Galega orientalis* root exudate[J]. FEMS microbiology letters, 2003, 219: 225-232.

[9] KANEKO T Y, NAKAMURA S, SATO E. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*[J]. DNA Res,2000,7:331-338.

[10] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature methods,2009,6(5):343-345.

[11] 王北艳,曹宁,汤晖.苜蓿中华根瘤菌电转条件的优化[J].安徽农学通报,2008(14):30-33.

[12] 刘巍峰,高东,鲍晓明,等.酿酒酵母可诱导启动子功能特性的研究[J].山东大学学报,1998,33(3):345-350.

[13] KASAI-MAITA H, HIRAKAWA H, NAKAMURA Y, et al. Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains[J]. Microbes and environments,2013,28:275-278.

[14] KOBAYASHI H, NACIRI-GRAVEN Y, BROUGHTON W J, et al. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234[J]. Molecular microbiology,2004,51(2):335-347.

[15] BANFALVI Z, NIEUWKOOP A, SCHELL M, et al. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*[J]. Mol Gen Genet, 1988,214: 420-424.

[16] PECK M C, FISHER R F, LONG S R. Diverse flavonoids stimulate *NodD1* binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*[J]. J Bacteriol,2006,188(15): 5417-5427.

[17] OKKER R J, SPAINK H P, LUGTENBERG B J, et al. Mutants in the *nodFEL* promoter of *Rhizobium leguminosarum*

bv. *viciae* reveal a role of individual nucleotides in transcriptional activation and protein binding[J]. Arch Microbiol,2001,175(2): 152-160.

[18] VAN RHIJN P,VANDERLEYDEN J. The Rhizobium-plant symbiosis[J]. Microbiol Rev,1995,59(1): 124-142.

[19] LAGUERRE G,LOUVRIER P,ALLARD M R,et al. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes[J]. Applied and environmental microbiology,2003,69(4): 2276-2283.

Construction and expression study of *Mesorhizobium loti* *nod-lacZ* fusions

PEI Junqing DUAN Liujian ZHANG Zhongming

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

Abstract The promoter sequences of *nodA*, *nodB*, *nodD* were cloned based on the genomic information of *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and fused with the reporter gene *lacZ* to construct the *nod-lacZ* fusion separately. Then these fusions were separately transformed into *M. loti* MAFF303099 and *Rhizobium* sp. NGR234 to detect the expression of these *nod* genes after induced by *Lotus japonicus* root extract (RE). The results showed that there was no expression of *nodA* when treated with root extracts. RE induced expression of *nodB* and *nodD*1, but showed upregulation of just 2-3 times. *nodD*2 expressed constitutively in *M. loti* MAFF303099. Neither of these induced the expression of *nodA* in *M. loti* MAFF303099 induced by 5 different flavonoid compounds separately, but the expression of *nodA* was detected in NGR234 strain treated by Luteolin.

Keywords *Mesorhizobium loti*; nodulation genes; root extract; *nod-lacZ* fusion

(责任编辑: 张志钰)