

华癸中慢生根瘤菌 7653R *SraG* sRNA 的共生固氮功能

李振鹏 马春草 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 基于前期对华癸中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R sRNA (small non-coding RNA, sRNA) 的生物信息学预测, 经 Northern blot 验证获得 *SraG* sRNA。本研究采用 RACE 与转录组高通量深度测序确定了 *SraG* 全长, 并分别利用 RNAfold 软件和 TargetRNA 软件预测了 *SraG* 二级结构和靶位点, 进而构建了 *M. huakuii* 7653R 的 *SraG* 插入失活突变体(*M. huakuii* *SraGmut*), 并对突变体接种紫云英的共生表型进行了检测。盆栽试验结果表明, 与野生型菌株 *M. huakuii* 7653R 相比, 接种突变株 *M. huakuii* *SraGmut* 的固氮能力显著下降, 突变株固氮酶活性下降约 40%, 植株鲜质量和根瘤数目也显著降低。结果表明, *SraG* 的功能与 *M. huakuii* 7653R 的共生固氮过程相关, 作为 sRNA 可能参与根瘤菌的共生固氮调控过程。

关键词 华癸中慢生根瘤菌; sRNA; 突变体; 共生固氮; 表型

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0051-07

原核生物中的 ncRNA 是一类长度在 50~500 nt 之间的 RNA 分子, 统称为 small RNA (sRNA)。sRNA 一般至少具有 2 个或 2 个以上的颈环结构。通过形成特殊的颈环结构, sRNA 与靶位点完全或部分互补调控基因的转录或翻译; 依赖这种颈环结构, sRNA 又与伴侣蛋白 Hfq 相结合使其分子构象稳定; 通过分子结构上的构象变化, sRNA 也与环境中的效应因子结合从而对胁迫条件做出应答。在细菌中, sRNA 通过调节 rRNA 的甲基化、抑制或激活 mRNA 的翻译和转录、隔离或降解功能蛋白等多种细胞功能进行调控。sRNA 调控的功能涉及细胞分裂、抗生素抗性、碳代谢、铁平衡、RNA 聚合酶的功能和生物膜的形成, 并对胁迫条件如氧、外膜的酸碱盐等浓度变化、胞内磷酸糖的积累等做出反应^[1-4]。

华癸中慢生根瘤菌 7653R (*M. huakuii* 7653R) 为我国特有的根瘤菌资源^[5-7], 仅有紫云英一个互接种族, 其基因组序列具有种的保守型和特异性。笔者所在课题组前期完成了 *M. huakuii* 7653R 的基因组测序和基因注释等相关工作^[8], 并通过生物信

息学预测和 Northern blot 分析和鉴定了 *M. huakuii* 7653R 的 sRNA, 最终获得 1 个大小约为 200 bp、在共生、厌氧、共生晚期和自生条件下均高丰度表达的 sRNA, 命名为 *SraG*^[9]。

本研究采用 RACE 和高通量测序获得 *SraG* 全长, 通过生物信息学方法预测 *SraG* RNA 的二级结构和靶位点, 进而构建 *SraG* 插入失活突变载体, 观察突变体菌株的共生表型, 以期获得 *SraG* 对紫云英根瘤的固氮能力产生影响的直接证据, 为挖掘与共生固氮功能相关或直接参与调控共生固氮过程的 sRNA, 并为其作用机制的揭示奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆基因载体 pMD18-T、Ex-Taq 酶均购自大连 TaKaRa 有限公司。华癸中慢生根瘤菌 (*M. huakuii* 7653R)、辅助菌 2073 均为华中农业大学微生物学国家重点实验室生物固氮分室所保存。PCR 仪为 Bio-Rad 公司生产, T4 连接酶、内切酶均购自 Fermentas 公司、提取总 RNA 所用试剂为 Invitro-

收稿日期: 2015-06-24

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)

李振鹏, 硕士研究生。研究方向: 根瘤菌共生固氮体系分子机理。E-mail: lizhenpeng@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

gen 公司的 Trizol 试剂。

1.2 华癸中慢生根瘤菌 7653R 总 RNA 的提取

将摘取的根瘤放于研钵中,加入液氮研磨。按照 1 mL/100 mg 加入 Trizol 试剂,待其完全融化澄清后于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。取上清于一支新 EP 管中,加入 0.2 mL 氯仿,充分混匀后 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。取上清于另一支新 EP 管中,加入等体积的异丙醇,冰上静置 10 min 后,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。去上清,加入 1 mL 75%乙醇洗涤,振荡混匀。4 ℃、12 000 r/min

离心 10 min,去上清。让乙醇充分挥发干净,加入 DEPC 水溶解。加入 DNase I 处理后,保存于 -80 ℃备用。

1.3 RNA 5'RACE

用 Alkaline phosphatase 处理根瘤总 RNA 1 h,使其 5'端磷酸基团进行去磷酸化,接着用 Tobacco Acid Pyrophatase 处理 1 h,使 5'帽子结构保留一个磷酸基团。对其进行 5' Adapotor 连接。进行完反转录后,进行巢式 PCR 扩增。巢式 PCR 反应中的引物见表 1。

表 1 SraG 5' RACE 扩增所用引物
Table 1 PCR primer used for SraG 5' RACE

名称 Name	引物序列 Sequence	作用 Function
Outer Primer	CGGCAAGTG GACGATTACTGATGATCAGTCGATG	SraG 5' RACE
Inter Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	
SraG inter Primer	AAGACCAGTAGCGTGCGCAAATTC	
SraG outer Primer	GTTCTTG GGCAGCAAAC	

1.4 克隆 SraG 全长

根据 SraG 序列,设计扩增 SraG 的引物:SraG-S; CGGGATCC CCGATCCTTCGCATTGGCA SraG-AS; CCCAAGCTTTTTCGTACGCGATGGTGTGT (下划线部分为酶切位点),以 *M. huakuii* 7653R 总 DNA 为模板扩增 SraG,后 TA 克隆于 pMD18-T 载体中,挑选阳性克隆子送交南京金斯瑞公司测序。挑取序列正确的单菌落接种于 4 mL LB 中,培养至 D_{600} 为 0.8 时收集菌体,抽取质粒,用 Bam H I 酶和 Hind III 酶进行双酶切,回收酶切产物。

1.5 SraG 插入失活突变载体的构建和筛选

挑取新鲜的 pK19mob 单菌落,菌落接种于 4 mL LB 中,培养至 D_{600} 为 0.8 时收集菌体,抽取质粒,用 Bam H I 酶和 Hind III 酶进行双酶切,回收酶切产物。将酶切后的 SraG 插入 pK19mob 载体中。用三亲本接合转移的方法将 SraG 插入失活突变载体导入 *M. huakuii* 7653R 中,并在 AMS+Kan+Str 的平板上筛选阳性克隆子。以引物 M13F 和 SraG 下游基因的序列(SraGouteras; CCAAGCGCGCGGTG-GCGGCAGCC)为引物检测克隆子。

1.6 紫云英盆栽试验

选取大而饱满且呈浅绿色的紫云英种子,用 75%乙醇处理 5 min,3%NaClO 处理 10 min,然后用无菌 ddH₂O 冲洗 7~9 次,将紫云英种子浸泡在 ddH₂O 中 2 h;之后将种子铺在水琼脂平板上,倒置放于 23 ℃光照培养箱内 2 d,种于无菌的沙钵中,待子叶展开(约 5 d)后分别接种 *M. huakuii* 7653R 与

M. huakuii SraGmut, 30 d 后对植物地上部分鲜质量、地下部分根瘤数量等指标进行统计。

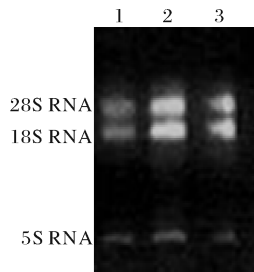
1.7 固氮酶活测定

参照文献[7]采用乙炔还原法测定固氮酶活。

2 结果与分析

2.1 华癸中慢生根瘤菌 7653R 总 RNA 的提取与质量检测

首先利用紫外分光光度计测定样品的吸光度,检测结果显示 $D_{260}/D_{280}=1.92$,表明样品无蛋白或酚类的杂质污染; $D_{260}/D_{230}=1.90$,说明无碳水化合物(糖类)、盐类或有机溶剂污染。其次,用琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的质量,发现 RNA 未被降解(图 1),可以用于后续实验。



1~3:华癸中慢生根瘤菌 7653R RNA。1-3:RNA of *M. huakuii* 7653R.

图 1 华癸中慢生根瘤菌 7653R RNA 的电泳检测

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

2.2 *SraG* 全长的获得

为获得 *SraG* 5' 端序列,本研究按照 5'-full RACE 试剂盒步骤进行操作,巢式 PCR 结束,琼脂糖凝胶电泳检测后发现在 180 bp 附近有 1 条清晰的条带(图 2)。回收 PCR 产物测序,经与 NCBI blast 比对后确认其序列正确;并进行了基于烟草磷酸酶(tobacco acid pyrophosphatase)处理的 *M. huakuii* 7653R 转录组高通量深度测序,进一步确认 *SraG* 5'RACE 的结果是准确的。并通过高通量深度测序结果获得 *SraG* 3' 端序列,得到了 *SraG* 全长:

GTACGCGATGGTGTGTAGCCGTGCGGCTC-
GTGAAGGAATTTGCCACGCTACTGGTCTT-
TTGCTCGAAGCATTTCCGGCAGTTTGCTGC-
CCAAGGAACCGCATCGCCGCAATCTCGC-
ACTTGACAAACTTATATTGCACTGCAGTAT-
GGGTCGGGGCGGGAATGCGAGCCGGGTTC-
GGATGTGTACCGCCGTGCCCTTTCGCA

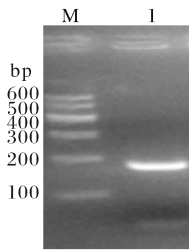


图 2 PCR 扩增 *SraG* 5'端

Fig.2 PCR amplification of the 5' *SraG*

2.3 RNAfold 预测 sRNA 二级结构

不同于 mRNA, non-coding RNA 可以形成具有多个颈环的复杂二级结构和特定功能序列如 Hfq 结合位点和 SD 序列,这是实现 sRNA 调控功能的关键因素^[10-11]。笔者采用 RNAfold 软件对 *SraG* RNA 的二级结构进行预测,发现 *SraG* RNA 具有 4 个以上颈环结构,且 CG 含量高达 58.04%,符合 sRNA 的特征。而在富含 A/U 处可能为 Hfq 蛋白结合位点(图 3)。

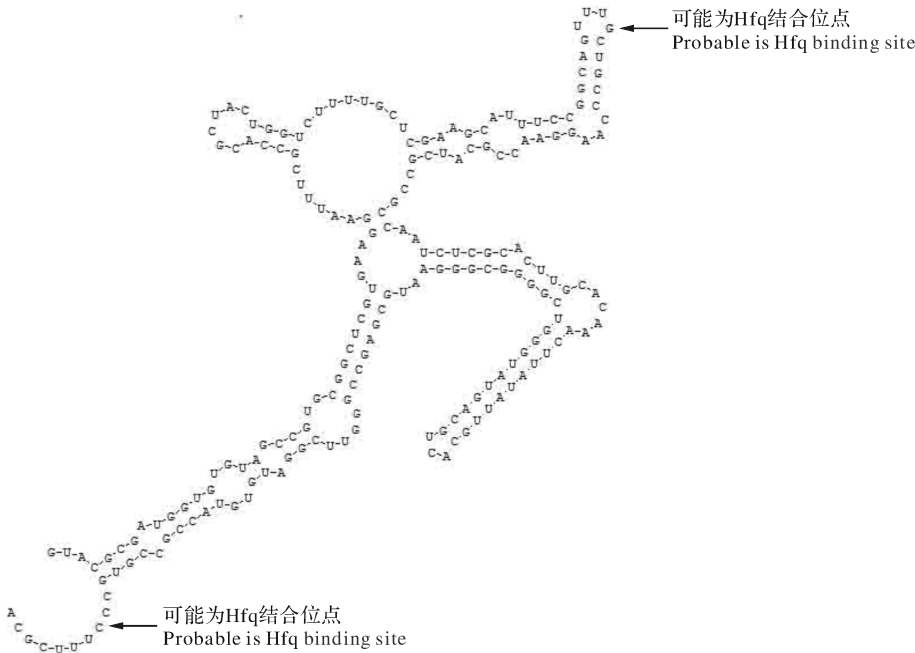


图 3 RNAfold 预测 *SraG* RNA 二级结构

Fig.3 The secondary structure of *SraG* RNA by RNAfold prediction

2.4 *SraG* RNA 靶位点预测

sRNA 可以通过与靶位点的作用发挥调节功能。采用 Target RNA 软件^[12]进行 *SraG* RNA 靶位点的预测,对 *SraG* 序列与 TargetRNA 数据库中的根瘤菌数据库进行分析,找到 *SraG* 可能作用的靶位点(表 2),其中的 LysR 家族转录调控子、GntR

家族转录调控子等调控子与生物固氮过程相关^[13-14]。

2.5 *SraG* 插入失活突变载体的构建

采用本文“1.5”设计的引物,以 *M. huakuii* 7653R 总 DNA 为模板,扩增两端带有 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点的 *SraG* 全长(图 4),获得预期大小为

205 bp 的片段。测序正确后克隆到相同双酶切后 *SraG*。经双酶切(图 5)及测序后分析 *SraG* 克隆的 pK19mob 质粒上, 构建重组质粒 pK19mob- 正确。

表 2 *SraG* RNA 靶位点预测

Table 2 The prediction for targeted gene of <i>SraG</i> RNA		
IG	上游基因功能描述 Functional description of the upstream gene	下游基因功能描述 Functional description of the downstream gene
nqo4...nqo2	NADH 脱氢酶亚基 D Subunit D of NADH dehydrogenase	NADH 脱氢酶亚基 E Subunit E of NADH dehydrogenase
RL3618...RL3619	LysR 家族转录调控子 LysR family transcription factor	假设蛋白 Hypothetical protein
RL2691...RL2692	假设蛋白 Hypothetical protein	假定 DAHP 合成酶蛋白质 Putative DAHP synthetase protein
RL3058...RL3059	细胞被膜蛋白 Cell envelope membrane protein	假设蛋白 Hypothetical protein
RL4165...RL4166	假定乙二醛酶家族的蛋白质 Putative glyoxalase family protein	假设蛋白 Hypothetical protein
RL3371...RL3372	ABC 转运体 ATP 结合蛋白 ATP binding protein of ABC transporter	GntR 家族转录调控子 GntR family transcription factor
RL0789...RL0790	假设蛋白 Hypothetical protein	TetR 家族蛋白 TetR family protein
ppx...RL1601	外切磷酸酶 Exo-phosphatase protein	假设蛋白 Hypothetical protein

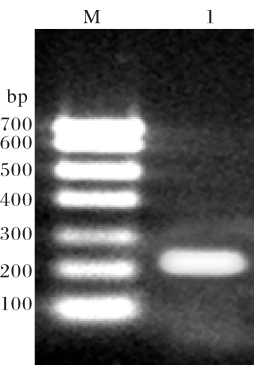
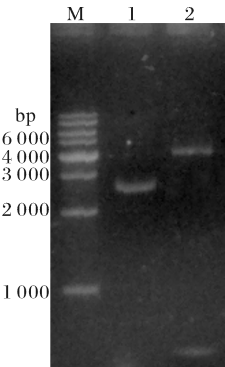


图 4 PCR 扩增 *SraG* ORF

Fig.4 PCR amplification of the *SraG* ORF



M:DNA marker; 泳道 1:质粒 pK19mob-*SraG*; 泳道 2:质粒 pK19mob-*SraG* *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切验证。 Lane1:Plasmid pK19mob-*SraG*; Lane 2: Enzymatic digestion by *Bam*H I 和 *Hind*III。

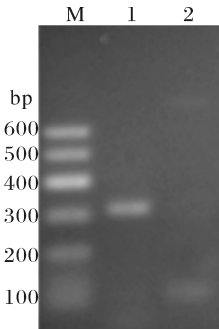
图 5 质粒 pK19mob-*SraG* 酶切验证

Fig.5 pK19mob-*SraG* digested by restriction endonucleases

2.6 *SraG* 插入失活突变菌株的筛选

将含有 pK19mob-*SraG* 质粒的大肠杆菌、*M. huakuii* 7653R 和辅助菌 2073 三亲本接合转移后稀释涂布于 AMS+Str+Kan 平板上筛选阳性克隆子。

以 M13F 引物与 *SraG* outer 为引物扩增验证筛选的阳性克隆子,可以扩增出清晰的大小为 300 bp 左右的条带,而用引物 *SraG*-S 和 *SraG*-AS 不能扩增出 *SraG* 的 ORF(图 6),证明筛选得到了 *SraG* 插入失活突变菌株(*M. huakuii* *SraGmut*)。



M:DNA marker; 泳道 1:引物 M13F 和 *SraG* outer PCR 验证; 泳道 2:PCR 扩增 *SraG* 全长。 Line 1:PCR amplification with M13F and *SraG* outer; Line 2:PCR amplification of *SraG* ORF.

图 6 *SraG* 插入失活突变菌株的 PCR 验证

Fig.6 Identify *M. huakuii* *SraGmut* by PCR

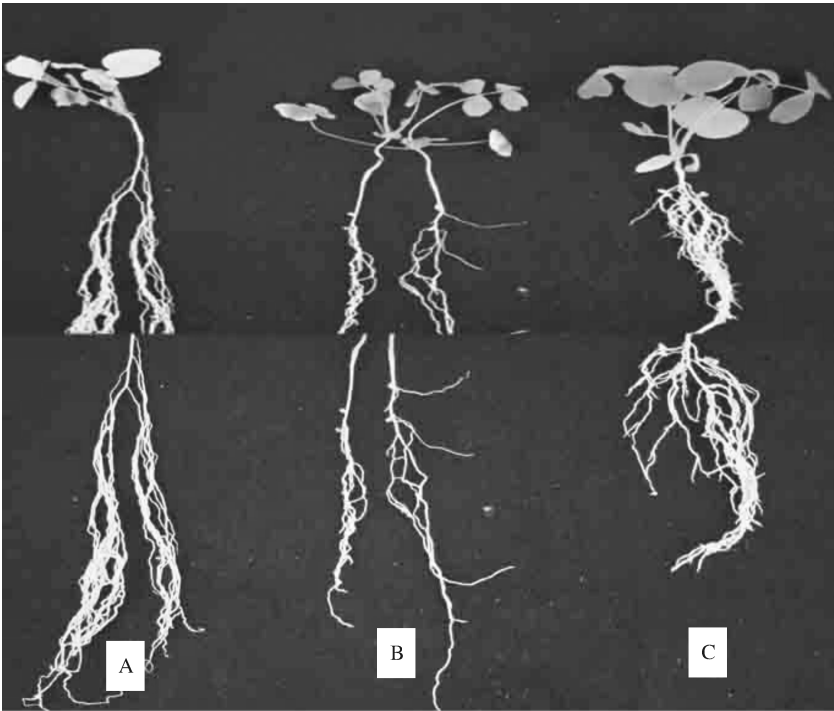
2.7 突变体菌株的共生表型

为准确鉴定 *SraG* 在宿主植物共生固氮中的作用,本研究进行了紫云英盆栽试验,结果显示,与接种野生型 *M. huakuii* 7653R 相比,接种突变株 *M.*

huakuui SraGmut 的植物矮小、根系不发达;突变株的根瘤数量少、体积小、呈白色(图 7),但是其质量均比空白对照大。

接菌 30 d 后收集对照、接种 *M. huakuui* 7653R、*M. huakuui* SraGmut 的地上部植株与根

瘤,观察植株共生表型,并用乙炔还原法预测根瘤的固氮酶活,结果显示,接种 *M. huakuui* SraGmut 的植株根瘤的固氮酶活约为接种 *M. huakuui* 7653R 的 40%(表 3),表明 *SraG* 突变后导致根瘤菌共生固氮能力下降。



A:空白对照; B:接种 *M. huakuui* SraGmut 菌株; C:接种 *M. huakuui* 7653R。A:CK; B:Inoculating *M. huakuui* SraGmut; C:Inoculating *M. huakuui* 7653R.

图 7 供试菌株在紫云英上的结瘤情况

Fig.7 Nodules induced by strains tested on *Astragalus sinicus* L.

表 3 *M. huakuui* SraGmut 突变菌株共生表型
Table 3 Symbiotic phenotype of *M. huakuui* SraGmut

菌株 Strain	单株鲜质量/g Fresh biomass per plant	单株瘤数 Numbers of nodules per plant	单株瘤质量/g Biomass of nodules per plant	固氮酶活/($\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$) The average of nitrogenase activity
<i>M. huakuui</i> 7653R	0.21 $\pm$ 0.039a	13.00 $\pm$ 5.3a	0.029 $\pm$ 0.028a	25.30 $\pm$ 2.40a
SraGmut	0.14 $\pm$ 0.027b	9.13 $\pm$ 2.4b	0.120 $\pm$ 0.016b	10.10 $\pm$ 0.75b
CK	0.05 $\pm$ 0.004c	0.00	0.00	0.00

注:表中数据为 5 次重复的平均值;每列数据中有相同字母表示没有显著差异($P<0.05$)。Note:The data are the average of five replicates. Values in each column followed by the same letter are not significant difference ($P<0.05$).

3 讨 论

目前对根瘤菌 sRNA 的研究涉及 *Sinorhizobium meliloti*、*Rhodopseudomonas etli*、*Bradyrhizobium japonicum* 和 *Agrobacterium tumefaciens*, 其中关于 *S. meliloti* 的报道最多^[11-18]。在这些报

道中,对根瘤菌 sRNA 的研究重在挖掘和鉴定新的 sRNA,而对调控机制的研究特别是参与菌植互动与共生固氮过程的 sRNA 鲜有报道^[19]。Torres-Quesada 等^[20]对 *S. meliloti* 中调控支链氨基酸 ABC transporters 的 2 个结构类似的相邻 sRNA AbcR1 和 AbcR2 的功能进行了详细研究,结果显

示:AbcR1 和 AbcR2 在根瘤菌自由生长、分化的类菌体中均有表达,AbcR2 的表达在抗生素胁迫时和生长稳定期表达量最高,但 2 个 sRNA 的单、双缺失突变株均对共生表型没有太大影响,表明 AbcR1 和 AbcR2 对 *S. meliloti* 的共生固氮过程没有明显的调控功能,不是共生固氮必需的调控基因。

本研究通过构建 *SraG* 插入失活突变菌株(*M. huakuii* *SraGmut*)并接种紫云英进行盆栽试验,证实了 *SraG* 的功能与 *M. huakuii* 7653R 的共生固氮过程相关,可能参与根瘤菌的共生固氮调控过程。

对 *SraG* 的转录单元序列进行分析发现,*SraG* 上游结构基因功能为酰基转移酶家族的蛋白,下游结构基因功能为脱氢酶家族的蛋白。*SraG* 位于明确注释基因的间隔区,可能为反式编码 sRNA^[21-22]。RNAfold 软件预测 *SraG* RNA 具有 Hfq 结合位点,可以通过与 RNA 伴侣蛋白 Hfq 结合,与靶 mRNA 序列通过不完全配对,对靶 mRNA 进行调控^[23]。sRNA 可能与其靶基因 mRNA 5'端进行不完全互补配对,进而阻断靶基因的表达;还可以与 mRNA 的 3'端结合使该 mRNA 稳定^[16,24]。TargetRNA 软件预测 *SraG* 有 LysR 家族转录调控子、GntR 家族转录调控子、ABC 转运体 ATP 结合蛋白等多个与共生固氮相关的靶基因。紫云英盆栽试验结果表明,*SraG* RNA 对根瘤菌的固氮能力具有一定的影响,可能在 *SraG* 插入失活突变菌株中 *SraG* RNA 失去了对 LysR 家族转录调控子、GntR 家族转录调控子等靶基因的调控作用,进而影响了共生固氮过程。但关于 *SraG* RNA 准确的靶位点及对共生表型的影响机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] CHEE-HOCK H, RAABE C A, ROZHDESTVENSKY T S, et al. Bacterial sRNAs; regulation in stress[J]. International journal of medical microbiology, 2013, 303:217-229.
- [2] REPOILA F, DARFEUILLE F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria; physiology and mechanistic aspects[J]. Biology of the cell, 2009, 101:117-131.
- [3] RICHARDS G R, VANDERPOOL C K. Molecular call and response; the physiology of bacterial small RNAs[J]. Biochimica et biophysica acta, 2011, 809:525-531.
- [4] STORZ G, VOGEL J, WASSARMAN K, et al. Regulation by small RNAs in bacteria; expanding frontiers [J]. Molecular cell, 2011, 43:880-891.
- [5] 李一星, 李芳, 周鑫兰, 等. 利用细菌双杂交文库筛选华葵中慢生根瘤菌 7653R 中与外膜蛋白 Opa22 互作的蛋白[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2):28-33.
- [6] 李一星, 王建云, 石晓峰, 等. 紫云英非特异性转脂蛋白 AsIB259 的体外酶活性及在共生固氮中的功能 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3):19-25.
- [7] 路达, 彭杰丽, 谢福莉, 等. 华葵中慢生根瘤菌 7653R MCHK_8182 基因的共生固氮功能[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(4):56-61.
- [8] 王善明. 华葵中慢生根瘤菌 7653R 全基因组测序及比较基因组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [9] 邹铮铮. 华葵中慢生根瘤菌 7653R sRNA 的预测与初步鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [10] GOTTESMAN S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria[J]. Trends in genetics, 2005, 21(7): 399-404.
- [11] ZHANG Y, HONG G. Post-transcriptional regulation of NifA expression by Hfq and RNase E complex in *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, 41: 719-730.
- [12] SMITH L S, LONG S R. Requirements for *syrM* and *nodD* genes in the nodulation of *M. truncatula* by *Rhizobium meliloti* 1021[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1988, 11:937-970.
- [13] TJADEN B, GOODWIN S S, STORZ G, et al. Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria[J]. Nucleic acids research, 2006, 34:2791-2802.
- [14] 王毅. 苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) Rm1021 中 GntR 家族转录因子功能的初步研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2006.
- [15] ULVE V M, SEVIN E W, CHÉRON A, et al. Identification of chromosomal alpha-proteobacterial small RNAs by comparative genome analysis and detection in *Sinorhizobium meliloti* strain 1021[J]. BMC genomics, 2007, 8:467.
- [16] VALENTIN-HANSEN P, ERIKSEN M, UDESEN C, et al. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions[J]. Molecular microbiology, 2004, 51(6):1525-1533.
- [17] SCHLUTER J P, REINKENSMEIER J, DASCHKEY S, et al. A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* [J]. BMC genomics, 2010, 11:245.
- [18] RAMAKANTH M, PESSI G, VOSS B, et al. Small RNAs of the *Bradyrhizobium/Rhodopseudomonas* lineage and their analysis[J]. RNA biology, 2012, 9:47-58.
- [19] DEL-VAL C, ROMERO-ZALIZ R, TORRES-QUESADA O, et al. A survey of sRNA families in alpha-proteobacteria[J]. RNA biology, 2012, 9:119-129.
- [20] TORRES-QUESADA O, MILLAN V, NISA-MARTINEZ R, et al. Independent activity of the homologous small regulatory RNAs AbcR1 and AbcR2 in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* [J]. PloS One, 2013, 8: e68147 [2015-03-25]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068147>.
- [21] HERSHBERG R, ALTUVIA S, MARGALIT H. A survey of

small RNA-encoding genes in *Escherichia coli* [J]. Nucleic acids research,2003,31:1813-1820.

[22] VERCRUYSE M, FAUVART M, CLOOTS L, et al. Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs in *Rhizobium etli* expressed during free-living and host-associated growth using a high-resolution tiling array[J]. BMC genomics,2010, 11: 53.

[23] MAN S, CHENG R B, MIAO C C, et al. Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria[J]. Nucleic acids research,2011, 39:50.

[24] JAN R, SCHLÜTER J P, GIEGERICH R, et al. Conservation and occurrence of trans-encoded sRNAs in the *Rhizobiales* [J]. Genes,2011,2:925-956.

Symbiotic nitrogen fixation function of *SraG* sRNA
in *Mesorhizobium huakuii* 7653R

LI Zhenpeng MA Chuncao XIE Fuli CHEN Dasong LI Youguo

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

Abstract Based on the bioinformatics prediction of small non-coding RNA(sRNA), *SraG* sRNA was predicted and confirmed by Northern blotting. The full-lengh *SraG* was obtained with RACE and high-throughput sequencing of transcriptome. The secondary structure and target genes of *SraG* were predicted with RNAfold and TargetRNA software, respectively. To confirm the function of the *SraG* gene in symbiotic nitrogen fixation, a disruptant strain of *SraG* was constructed and named *M. huakuii* SraGmut. The pot experiments of plant nodulation were conducted to examine the nitrogen fixation ability of the disruptant strain. The nitrogenase activity of *A. sinicus* L. inoculated *M. huakuii* SraGmut was only 40% of that of inoculated *M. huakuii* 7653R, indicating that *SraG* as a RNA affected the symbiotic nitrogen ability of the rhizobium tested. It provides a solid foundation for studying the functional mechanism of sRNA during symbiotic nitrogen fixation of rhizobium in the future.

Keywords *Mesorhizobium huakuii* 7653R; sRNA; mutant; symbiotic nitrogen fixation; phenotype

(责任编辑:张志钰)