

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

李一星 王建云 石晓峰 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 将紫云英 *AsIB259* 基因编码的一个预测的非特异性转脂蛋白 *AsIB259* (nsLTP, non-specific lipid transfer protein) 在大肠杆菌表达菌株 Rosetta 2(DE3) 中进行了诱导表达, 体外测定 *AsIB259* 蛋白的脂质结合动力学特征, 检测它对不同碳链长度脂肪酸及其衍生物的结合能力, 进一步考查 *AsIB259* 超表达对紫云英毛根结瘤情况的影响。结果表明: *AsIB259* 具有转脂蛋白的典型特征, 与 16~22 碳链长度脂肪酸的结合活性较强, 对茉莉酸也表现出一定的结合活性; *AsIB259* 超表达导致根瘤数量增加 1.5 倍且固氮酶活性降低, 说明该基因在根瘤形成和固氮过程中发挥重要作用。

关键词 非特异性转脂蛋白; *AsIB259*; 体外表达; 脂质结合活性; 共生固氮

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)03-0019-07

植物非特异性脂质转移蛋白(non-specific lipid transfer protein, nsLTP) 是广泛分布于多种植物中的一类小分子分泌蛋白, 在体外可与多种脂质结合。它们含有高度保守的结构特征: 由 8 个位点高度保守的半胱氨酸残基形成 4 对二硫键和 2 个一致的五肽模体^[1]。目前已从多种植物中分离到 10 类 nsLTP, 其中在开花植物中常见的为 LTP1 和 LTP2 两个家族^[2]。两者二级结构基本相同, 但在分子质量、等电点和脂质转运活性等方面存在差异, 且序列同源性低于 30%^[3]。最初认为 LTP 的作用是参与脂类的转运^[4], 但后来的研究发现, 它们在植物中以家族形式存在, 在植物生长发育过程中发挥了多种功能, 如参与植物蜡质的合成和运输^[5]、参与角质层的形成^[6]、增加细胞壁的延展性^[7]、参与植物对生物及非生物胁迫的抗性^[8-9]、与花粉成熟有关^[10]、和钙调素结合起调控作用^[11]等; 最近还发现 LTP 在根瘤菌与植物共生过程中发挥作用^[12]。

豆科植物紫云英可与根瘤菌共生固氮, 在紫云英中存在一套与共生相关的功能基因^[13]。在前期工作中, 我们利用抑制差减杂交从紫云英中分离得到 2 个转脂蛋白基因 *AsE246* 和 *AsIB259*。分子质量和等电点预测结果表明, 二者均属于 LTP1, 但它

们的氨基酸序列同源性只有 19%^[14]。其中 *AsIB259* 编码蛋白预测大小为 14.8 ku, *AsIB259* 在根瘤中特异表达, 其转录水平呈现先升高后降低的趋势, 在接种根瘤菌 22 d 左右表达量达到最高, 在接菌 40 d 之后表达水平明显下降^[15]。这从一个侧面说明了它可能与根瘤发育和固氮功能有关。本研究将 *AsIB259* 编码蛋白在大肠杆菌中诱导表达, 测定了其脂质结合活性及与不同底物的结合能力, 并检测了该基因超表达对紫云英毛根结瘤表型及固氮活性的影响, 以期获得直接证据确证该蛋白的生化性质及其在共生固氮过程中的功能表型。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达菌株 Rosetta 2 (DE3) 购自 Novagen 公司, 该菌株可以识别稀有密码子; 发根农杆菌 K599 (*Agrobacterium rhizogenes* K599) 由华中农业大学生命科学技术学院张忠明教授赠送; 华癸中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) 7653R、表达质粒 pET28a(+) 和植物表达双元载体 pBI121 均为华中农业大学微生物学国家重点实验室生物固氮研究室保存; 克隆载体

收稿日期: 2013-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371549, 31071346 和 31000115)

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

pMD18-T 购自 TaKaRa 大连有限公司。PCR 仪为 Bio-Rad 生产; 荧光分光光度计 RF-5301PC 为岛津公司产品; Step One Real-time PCR System 购自 ABI。ExTaq 酶购自 TaKaRa 大连有限公司, T4 连接酶、各种限制性内切酶及反转录酶均购自 Fermentas 公司。RNA 抽提所用 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, 荧光定量试剂盒 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自 Applied Biosystem 公司。DNA 分子质量标准购自广州东盛生物科技有限公司, 蛋白质分子质量标准购自 Fermentas 公司。P-96 荧光探针 (1-萘月桂酸) 由 Invitrogen 公司提供, 未标记的不同碳链长度的脂肪酸为 Aladdin 公司产品。

1.2 紫云英根瘤组织材料的采集和总 RNA 的提取

紫云英种子先用 70% 的乙醇处理 5 min, 再用 3% 的 NaClO 处理 10 min, 然后无菌水洗涤 5~6 次, 将消毒后的种子用无菌水浸泡 2 h 后, 平摊于含有 0.5% 蔗糖和 1.2% 琼脂的平皿上, 置于光照培养箱中 22 °C 条件下萌发。待胚根长至 1 cm 左右时, 接种于无菌花盆中培养, 子叶展开后接种 *M. huakuii* 7653R。所有植株均用无氮营养液浇灌。接种后 28 d, 收集根瘤, 用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取根瘤总 RNA, 经 DNaseI 处理后于 -80 °C 保存备用。

1.3 AsIB259 大肠杆菌表达载体的构建

以接种后 28 d 的根瘤组织总 RNA 为模板, 用 oligo(dT)₁₈ 引物进行反转录得到 cDNA, 以引物 5'-CATGCCATGGTAATAATTATGGAAGCTAA-CAATGG-3' 和 5'-CCGCTCGA GCTTTCTCCAT-TCTGTTTCAGTG-3' PCR 扩增去掉信号肽的 *AsIB259* 编码区。扩增产物经回收连入载体 pMD18-T, PCR 和测序验证后, 用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切, 插入同样经双酶切的原核表达载体 pET28a(+) 中, 得到重组表达载体 pET259。

1.4 AsIB259 在大肠杆菌中的诱导表达

重组质粒 pET259 转化大肠杆菌 Rosetta 2(DE3), 经菌落 PCR 和酶切验证, 选择阳性转化子测序。挑取测序正确的阳性克隆的单菌落, 接种于 20 mL 含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 200 r/min 振荡培养过夜, 以 1% 的接种量转接到 250 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 D_{600} 达到 0.4~0.6, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导过夜后, 离心收集菌体, 经压力破碎后, 上清用镍柱纯化, 得到的蛋白样

品经超滤后溶于 10 mmol/L MOPS 缓冲液。

1.5 重组蛋白的脂质结合动力学分析和体外脂质结合活性测定

1) 重组蛋白的脂质结合动力学。将纯化后的重组蛋白溶于 10 mmol/L MOPS (pH 7.2) 缓冲液中制成酶液, 终浓度为 0.5 μ mol/L, 进行脂质结合动力学分析: 取 3 mL 酶液加入荧光测试杯中, 加入 20 μ L P-96 荧光探针 (30 μ mol/L), 使其终浓度为 0.2 μ mol/L, 立即进行荧光测定。激发波长为 343 nm, 发射波长为 378 nm, 自动记录 10 s 内 P-96 的荧光强度变化。

2) 重组蛋白脂质结合活性测定。取 3 mL 重组蛋白酶液, 加入荧光测试杯中, 然后加入不同体积的 P-96 母液, 测定荧光强度的变化, 以不含 AsIB259 的 MOPS 缓冲液作为对照。

1.6 不同碳链长度脂肪酸与重组蛋白的竞争结合实验

采用未标记荧光的不同碳链长度的脂肪酸进行竞争性结合实验, 这些脂肪酸包括: 脱落酸、茉莉酸、月桂酸 (C12)、豆蔻酸 (C14)、软脂酸 (C16)、硬脂酸 (C18)、花生酸 (C20)、山俞酸 (C22)。分别将这些脂肪酸溶于乙醇, 使其终浓度均为 3 mmol/L。在荧光测试杯中加入 3 mL 0.5 μ mol/L 的酶液, 再加入 50 μ L P-96 母液使其终浓度为 0.5 μ mol/L, 此时记录最大荧光强度值。然后向测试杯中加入不同体积的未标记脂肪酸, 检测荧光强度变化。

1.7 AsIB259 超表达载体的构建

以引物 5'-GCTCTAGAGCATGGTGAT-GAACTTCAAAGTTACTA-3' 和 5'-CGGGATCCCGTTACTTTCTCCATTCTGTTTCAGGT-3' 扩增两端带有 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点的 *AsIB259* 编码区序列, 产物经回收后克隆到 pMT18-T 载体, 测序正确后用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切, 正向连接到植物双元载体 pBI121 上, 得到超表达载体 pBI259。

1.8 发根农杆菌介导的紫云英毛根转化实验

将超表达载体和空载体分别用电转化法转入发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) K599, 在含有 100 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 链霉素的 LB 平板上筛选。挑选阳性克隆, 接入添加了 100 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 链霉素的 20 mL LB 液体培养基中, 200 r/min 振荡培养过夜。然后将 200 μ L 菌液接种于 100 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基中,

振荡培养至 D_{600} 达到 1.0。将萌发 5 d 的无菌苗从下胚轴中部切断,在上述菌液中侵染 10 min,吸干多余菌液后置于 MS 平板上共培养。共培养 3 d 后,转到含有 500 mg/L 羧苄青霉素的 MS 培养基上继续培养。约 3 周后,将每条毛根的根尖进行 GUS 染色,剪去未转化的根,使每株植株保留 1~3 条转基因毛根。然后将植株转入无菌花盆,饥饿培养 3 d 后,接种野生型 *M. huakuii* 7653R 菌株进行结瘤试验,以转化了空载体的毛根为对照。

2 结果与分析

2.1 AsIB259 大肠杆菌表达载体的构建

为了检测 AsIB259 是否具有脂质结合活性,我们将该蛋白在大肠杆菌中表达并体外检测其脂质结合活性。以接种后 28 d 的根瘤组织总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增得到去掉信号肽的 AsIB259 编码区序列,预期大小为 399 bp,琼脂糖凝胶电泳显示扩增产物符合预期大小(图 1A)。重组表达质粒 pET259 用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳(图 1B)显示有 2 条带,其中 1 条位于 400 bp 处,用 *Nco* I 单酶切得到 1 条带。将双酶切得到的 400 bp 条带测序,结果证明与 AsIB259 完全一致,说明载体构建成功。

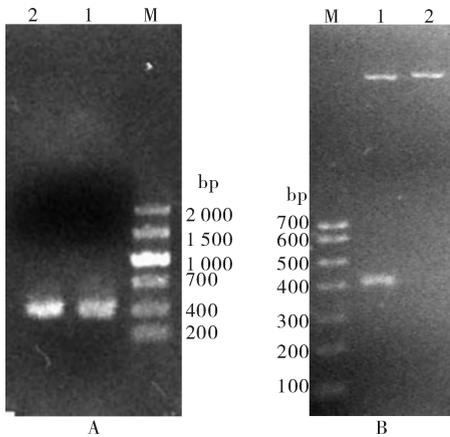


图 1 大肠杆菌表达载体 pET259 的酶切验证
Fig. 1 The enzymatic digestion of expression vector pET259

2.2 重组蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

将原核表达载体 pET259 转入大肠杆菌 Rosetta 2(DE3),以 0.1 mmol/L IPTG 诱导 16 h,破碎细胞后,将上清、沉淀和总蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果发现重组蛋白主要存在于总样和上清中(图 2)。重组蛋白的 C 端带有 His-tag 标签,因此上清蛋白用镍柱纯化,得到重组蛋白。将纯化后的蛋白用 SDS-PAGE 电泳检测,其大小约 15 ku,与预期相符。

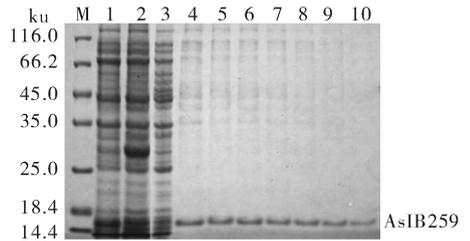


图 2 AsIB259 蛋白在大肠杆菌中诱导表达的 SDS-PAGE 电泳检测
Fig. 2 SDS-PAGE detection of recombinant protein AsIB259 expression in *E. coli*

2.3 重组蛋白的脂质结合动力学特征

当 20 μ L P-96 荧光探针加入重组 AsIB259 蛋白溶液后,溶液的荧光强度迅速增加,达到半数最大值的时间约为 4 s,6 s 之后进入平台期,荧光强度不再增加(图 3)。这一曲线的特征与谢万钦等^[16]报道的白菜 CaMBP-10 和 Guerbette 等^[17]报道的玉米 nsLTP 与 P-96 结合的动力学曲线特征一致,说明 AsIB259 具有典型的转脂蛋白特性。

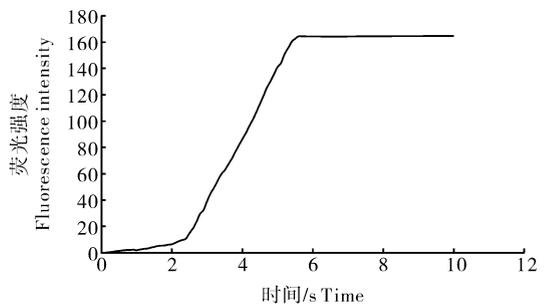


图 3 AsIB259 重组蛋白与 P-96 结合的动力学曲线
Fig. 3 Kinetics of the binding of recombinant protein AsIB259 to P-96

2.4 重组蛋白体外脂质结合活性

在重组蛋白酶液中加入不同体积的 P-96 荧光探针,测定 AsIB259 的体外脂质结合活性,以不含 AsIB259 的 MOPS 缓冲液作为对照。P-96 在水溶液中所发荧光极弱,当进入 nsLTP 分子的疏水空穴并与其结合后,荧光大大增强,然而当第 2 个脂肪酸分子 (P-96) 进入时,荧光开始淬灭^[16]。我们的检测结果表明 AsIB259 与 P-96 的结合符合这一典型特征,如图 4 所示:随着 P-96 浓度的增加,荧光逐渐增强,直至最大,当 P-96 > 1.2 $\mu\text{mol/L}$, 荧光强度不再增加。

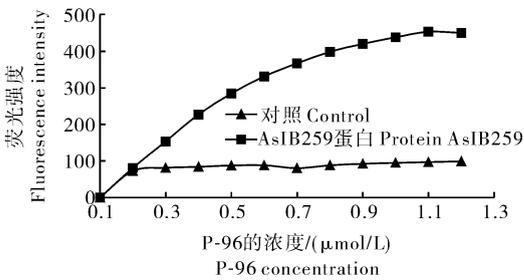


图 4 重组 AsIB259 蛋白的脂质结合活性

Fig. 4 Lipid-binding activity of recombinant protein AsIB259

2.5 重组蛋白与不同脂肪酸底物的结合活性

利用未标记的脂肪酸与 P-96 荧光探针竞争结合重组蛋白检测荧光强度变化,结果显示各脂肪酸均可以和 P-96 竞争结合重组蛋白,但是竞争结合能力根据其碳链长度不同表现出一定差异性 (图 5)。与较短碳链长度的脂肪酸相比,碳链长度为 16~22 个碳原子的脂肪酸竞争结合能力更强,其中 16 个碳原子的脂肪酸竞争结合能力最强。另外,重组蛋白对茉莉酸也表现出一定程度的亲和性,而脱落酸的竞争结合能力较弱。

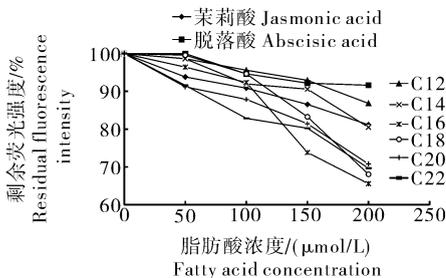
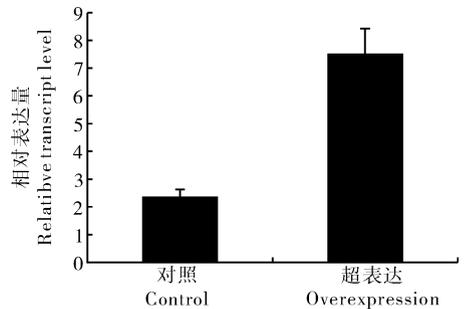


图 5 不同脂肪酸与重组 AsIB259 蛋白的竞争结合能力

Fig. 5 Competition abilities between different fatty acids binding to the recombinant protein AsIB259

2.6 AsIB259 超表达对紫云英毛根结瘤表型的影响

取接种根瘤菌 *M. huakuii* 7653R 30 d 后的超表达和对照嵌合型植株各 10 株,收获根瘤,采用 Real-time RT-PCR 方法检测超表达效率,引物为 5'-TCTTTCTGCTGTTGC-3' 和 5'-CGAGT-GAGATGACGAGGC-3',结果如图 6 所示。超表达根瘤中,AsIB259 的转录水平平均为对照根瘤的 3.5 倍,说明该基因被超表达。盆栽结果表明对照和超表达的发根均正常结瘤,接种后 30 d 观察转化植株地上部分发现,超表达植株与对照植株相比长势稍好,但差异不显著 (图 7A)。然而分别从不同植株上采集超表达和对照发根各 10 根,统计根瘤数量发现:超表达发根平均根瘤数量增加为对照的 1.5 倍,二者在根瘤颜色和形态上无显著差别 (图 7 A、C)。以上结果说明:AsIB259 超表达对结瘤具有促进作用。



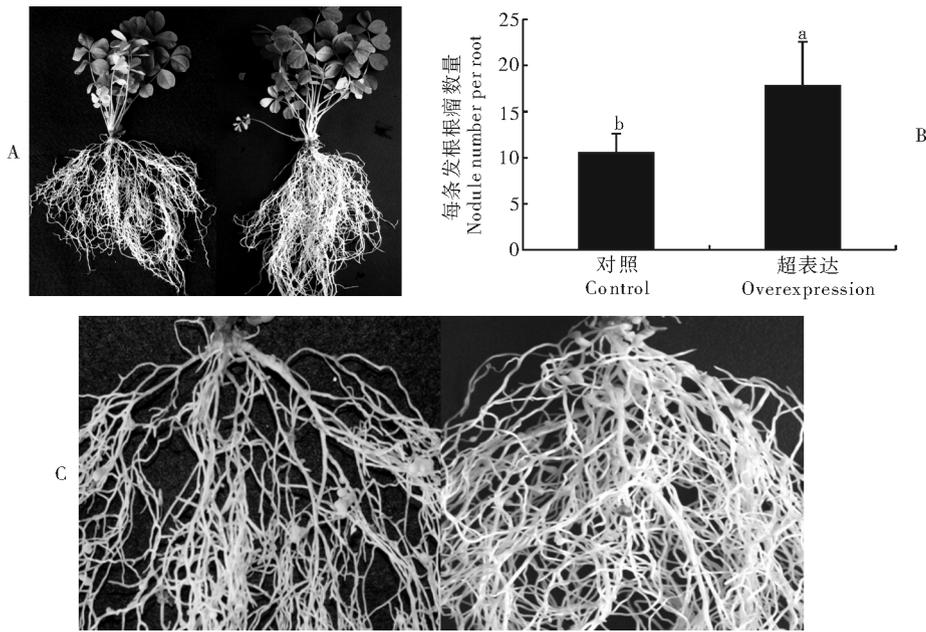
荧光定量 RT-PCR 方法检测接种 30 d 根瘤中的超表达效率,对照为转化了空载体 pBI121 的根瘤 The transcript level in nodules at 30 d after inoculation was detected by SYBR quantitative RT-PCR and nodules transformed by empty pBI121 served as the control.

图 6 AsIB259 在根瘤中的超表达效率检测

Fig. 6 The efficiency assay of AsIB259 overexpression in nodules

2.7 AsIB259 超表达对根瘤固氮酶活性的影响

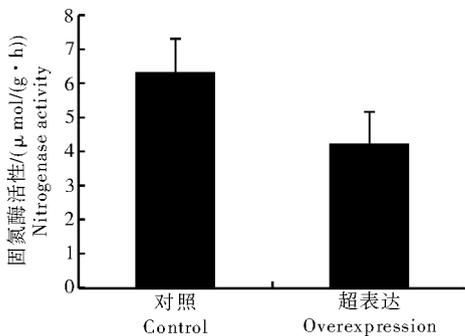
收获接种根瘤菌 7653R 30 d 后的对照和超表达嵌合型植株各 9 株,剪去地上部分,收集地下部分 (包括毛根和根瘤),利用乙炔还原法测定固氮酶活性,结果 (图 8) 表明:超表达根瘤的固氮酶活低于对照根瘤,只有对照组的 2/3。这一结果与 2 种植株地上部分的长势情况相符,虽然超表达毛根结瘤数量较多,但其根瘤的固氮酶活却低于对照组,因此 2 种植株地上部分长势并无显著差别。



A: 对照和超表达植株的根瘤数量比较, 以转化了空载体 pBI121 的嵌合型植株为对照, 图中数据为接种后 30 d, 分别统计 10 株对照和 10 株超表达植株得到的平均值, 不同字母代表在 $P < 0.05$ 水平差异显著 Nodule numbers on control and overexpression composite plants. Composite plants transformed with empty pBI121 served as the control. The data represented the average value of ten control plants or ten overexpression ones at 30 d after inoculation and the data with different letters are significantly different at $P < 0.05$; B: 对照和超表达植株的结瘤情况比较, 左: 对照植株, 右: 超表达植株 Nodulation phenotype of control and overexpression composite plants. Left: Control, Right: Overexpression plantlets; C: B 图的局部放大图, 左: 对照植株, 右: 超表达植株 Magnification of B. Left: Control, Right: Overexpression plantlets.

图 7 AsIB259 超表达对毛根结瘤的影响

Fig. 7 The effect of AsIB259 overexpression on hairy root nodulation



各取 9 株接种后 30 d 的对照和超表达嵌合型植株, 测定根瘤固氮酶活, 对照组为转化了空载体 pBI121 的根瘤, 重复 3 次 After inoculation for 30 d, nine control and nine overexpression plantlets were harvested respectively for nitrogenase activity assay. Composite plants transformed with empty pBI121 served as the control. The data represented the average value of three replicates.

图 8 AsIB259 超表达对根瘤固氮酶活的影响

Fig. 8 The effect of AsIB259 overexpression on root nodule nitrogenase activity

3 讨论

AsIB259 是我们前期分离、克隆获得的 1 个紫

云英根瘤特异表达的结瘤素基因, 其编码蛋白具有典型的 nsLTP 结构域, 预测其为 nsLTP1 家族成员。本研究将 AsIB259 在大肠杆菌 Rosetta 2 (DE3) 中成功表达并纯化, 证实了该蛋白确实具有 nsLTP 的生物活性, 而且该蛋白的超表达影响了根瘤数量和固氮酶活性。

植物非特异性转脂蛋白广泛分布于各种植物中, 来自豆科植物的 LTP 基因早有报道, 例如绿豆 (*Phaseolus mungo*) 的 1 个 LTP 基因^[18], 菜豆 (*Vigna unguiculata*) 的 *pvr3*^[19], 还有被认为与共生早期相关的苜蓿 *MtN5*^[20] 等。但是有关其功能的研究一直以来鲜有报道, 直到 2009 年 Pii 等^[12] 提供了有力的试验证据证明苜蓿 *MtN5* 确实与共生固氮有关。最近该研究小组又提出 *MtN5* 的作用发生于结瘤因子之后, 可能参与皮层细胞中与根瘤菌侵染相关的信号传递, 调控根瘤菌的侵染^[21]。虽然同属于 nsLTP, AsIB259 却有着不同于 *MtN5* 的特点: *MtN5* 属于 LTP2 家族, 而 AsIB259 属于 LTP1 家族; 更重要的是 *MtN5* 在侵染早期即有表

达且在根和根瘤中均表达,而 *AsIB259* 只在根瘤中特异表达,这暗示着它们二者之间可能具有不同的功能或作用机制。

在病原菌和植物的互作过程中,LTP 在植物抗性应答的信号途径中发挥重要作用。它可与多种脂肪酸及其衍生物如水杨酸和茉莉酸等结合,参与植物防御反应。Maldonado 等^[22]提出拟南芥的 1 个 nsLTP (DIR1)可传导 1 种重要的信号,且 DIR1 可以通过与 1 个脂类来源的分子互作来促进这种长距离的信号传递。Pii 等^[23]也提出 MtN5 和 DIR1 等一些 nsLTP 成员组成了 LTP 家族中一个新的亚家族,即和脂质信号传递相关的 LTP 亚家族。Buhot 等^[24]对烟草 LTP 的研究发现,虽然它可以和多种脂肪酸及其衍生物结合,但是只有与茉莉酸的结合最有效。本研究中,重组蛋白 *AsIB259* 在体外也可以和茉莉酸结合,而茉莉酸等在共生固氮过程中可能调控结瘤和根瘤发育^[25];另一方面,本研究观察到 *AsIB259* 在紫云英毛根中超表达导致根瘤数量增加、固氮酶活降低。这些结果启示我们:*AsIB259* 在共生固氮过程中的功能机制是否与茉莉酸信号的传递途径有关,或者与其他某种(些)脂类发生互作,从而在紫云英等豆科植物与根瘤菌的共生固氮中发挥关键作用,这些科学问题均需要深入研究。

参 考 文 献

- [1] MALDONADO A M,DOERNER P,DIXON R A,et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*[J]. *Nature*,2002,419:399-403.
- [2] EDSTAM M M,VIITANEN L,SALMINEN T A,et al. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins[J]. *Mol Plant*,2011,4(6):947-964.
- [3] 刘芳,卢长明.植物非特异脂质转运蛋白研究现状与展望[J]. *遗传*,2013,35(3):307-314.
- [4] KADER J C. Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber[J]. *Biochim Biophys Acta*,1975,380:31-44.
- [5] KUNST L,SAMUELS A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax[J]. *Prog Lipid Res*,2003,42(1):51-80.
- [6] TAPIA G,MORALES-QUINTANA L,PARRA C,et al. Study of nsLTPs in *Lotus japonicus* genome reveal a specific epidermal cell member (LjLTP10) regulated by drought stress in aerial organs with a putative role in cutin formation[J]. *Plant Mol Biol*,2013,82:485-501.
- [7] NIEUWLAND J,FERON R,HUISMAN B A,et al. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco[J]. *Plant Cell*,2005,17:2009-2019.
- [8] CARVALHO A O,GOMES V M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review[J]. *Peptides*,2007,28:1144-1153.
- [9] GUO L,YANG H B,ZHANG X Y,et al. Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis*[J]. *J Exp Bot*,2013,64(6):1755-1767.
- [10] PARK S Y,LORDE E M. Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion[J]. *Plant Mol Biol*,2003,51:183-189.
- [11] WANG C,XIE W,CHI F,et al. BcLTP, a novel lipid transfer protein in *Brassica chinensis*, may secrete and combine extracellular CaM[J]. *Plant Cell Rep*,2008,27:159-169.
- [12] PII Y,ASTEGNO A,PERONI E,et al. The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Mol Plant Microbe Interact*,2009,22:1577-1587.
- [13] 王宁,李一星,刘燕,等.紫云英结瘤受体激酶蛋白的筛选与鉴定[J]. *华中农业大学学报*,2013,32(2):6-11.
- [14] CHOU M X,WEI X Y,CHEN D S,et al. Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization[J]. *J Exp Bot*,2006,57:2673-2685.
- [15] 赵彩春,李一星,陈大松,等.紫云英 2 个转脂蛋白基因在共生及重金属胁迫条件下的表达特征[J]. *华中农业大学学报*,2011,30(1):18-22.
- [16] 谢万钦,赵立青,白文艳,等.钙调素对钙调素结合蛋白-10 和玉米非特异性脂转移蛋白与脂质结合活性的影响[J]. *植物生理与分子生物学报*,2006,32(6):679-684.
- [17] GUERBETTE F,GROSBOIS M,JOLLIOT-CROQUIN A,et al. Comparison of lipid-binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants[J]. *Biochemistry*,1999,38:14131-14137.
- [18] WANG S Y,WU J H,NG T B,et al. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean[J]. *Peptides*,2004,25:1235-1242.
- [19] CARVALHO A O,TEODORO C E S,CUNHA M D,et al. Intracellular localization of a lipid transfer protein in intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds[J]. *Physiol Plantarum*,2004,122:328-336.
- [20] YAHYAOU F E,KUSTER H,AMOR B B,et al. Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program[J]. *Plant Physiol*,2004,136:3159-3176.
- [21] PII Y,MOLESINI B,MASIERO S,et al. The non-specific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* is implicated in epidermal stages of rhizobium-host interaction [J/OL]. *BMC Plant Biology*,2012,12:233. <http://www.biomedcentral>.

com/1471-2229/12/233.

- [22] MALDONADO A M, DOERNER P, DIXON R A, et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2002, 419: 399-403.
- [23] PII Y, PANDOLFINI T, CRIMI M. Signaling LTPs a new plant LTPs sub-family? [J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5 (5): 594-597.
- [24] BUHOT N, GOMES E, MILAT M L, et al. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 5047-5052.
- [25] VAN DE VELDE W, GUERRA J C, DE KEYSER A, et al. Aging in legume symbiosis: a molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141: 711-720.

Activity *in vitro* and function of a non-specific lipid transfer protein AsIB259 from *Astragalus sinicus* in symbiotic nitrogen fixation

LI Yi-xing WANG Jian-yun SHI Xiao-feng CHEN Da-song LI You-guo

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

Abstract *AsIB259* encodes a putative non-specific lipid transfer protein in *Astragalus sinicus*. *AsIB259* protein was overexpressed in *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3) and the kinetics of the recombinant protein binding to P-96 fluorescence probe was examined. Simultaneously, its capacity of binding to different fatty acids and fatty acid derivatives was measured as well. Furthermore, the symbiotic phenotype associated with *AsIB259* overexpression was investigated. The results showed that *AsIB259* displayed high binding activity toward fatty acids with 16-22 carbon chain length; and its overexpression in hairy roots led to an increase of 1.5-fold nodule number, but to a decrease of nitrogenase activity. The results indicated that *AsIB259* may play an important role in nodulation and nitrogen fixation.

Key words non-specific lipid transfer protein; *AsIB259*; protein expression *in vitro*; lipid binding activity; symbiotic nitrogen fixation

(责任编辑:张志钰)