

外源 AHL 对中慢生型天山根瘤菌群体感应系统作用的初步研究^①

徐翔, 郑会明, 杜寒春, 汪洋, 钟增涛*, 朱军

(南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 通过将天山根瘤菌中的自体诱导物合成酶基因 *mrtI* 在转录水平融合 *lacZ* 构建了 5'*mrtI-lacZ* 融合表达菌株 HMZ1。利用多株不同属的根瘤菌上清液对该菌株进行诱导, 发现有 3 株豌豆根瘤菌和 1 株三叶草根瘤菌上清提取物能诱导 *mrtI* 基因的表达, 且外源上清量越多, *mrtI* 被诱导的程度越高, TLC 的结果则显示它们可能有着相同的 AI。该结果显示在相同功能的细菌间存在信号交流, 为进一步研究群体感应调节在共生固氮上的作用提供了理论及实践依据。

关键词: 群体感应; 自体诱导物; 中慢生型天山根瘤菌

中图分类号: Q933

群体感应 (quorum sensing, QS) 是指当细菌的数量达到一定的密度 (quorum) 时才能发生的感应 (sensing) 现象, 即细菌能够通过某些特定信号分子的浓度变化来感知周围环境中自身或其它细菌的数量变化, 当信号分子达到一定浓度阈值时, 启动相关基因的表达来适应环境的变化^[1-2]。参与调节群体感应信号分子合成及其相关操纵元组成的系统被称为群体感应系统。革兰氏阴性细菌中的 QS 系统主要由 *N*-acyl-homoserine lactones (AHL) 类信号分子及其受体蛋白组成; 革兰氏阳性细菌不产生 AHL, 其 QS 系统主要利用 Autoinducing peptide (AIP) 为信号分子^[3]。除了具有细菌特异性的 AHL 或 AIP 信号分子, 还有一类 AI-2 型信号分子^[4], 其在所有细菌中均为呋喃酰硼酸二酯, 细菌可以利用这类信号分子感知其它细菌数量来调控自身的行为。目前, 在许多原核生物中都发现了群体感应系统, 调节其各种生理学反应和某种特定功能, 如: 生物发光、质粒转移、生物膜形成和抗生素生物合成等, 对群体感应的研究成为微生物学的一大热点^[5]。

据估计, 全球生物固氮量约为 17500 万 t, 而现今工业上采用的 Haber-Bosch 法固定的大气无机氮量约为 4500 万 t, 不及生物固氮量的 1/3。其中豆科植物-根瘤菌的共生固氮量为 3500 万 t, 几乎可以与工业法固定的无机氮相媲美。根瘤菌与其宿主豆科植物建立共生关系的过程是一个复杂的信号交流过程。根瘤菌可以侵入豆科植物根部形成根瘤^[6], 固定空气

中的分子氮, 与植物建立互惠的共生关系^[7-8]。根瘤菌在植物细胞中形成的类菌体具相当的细胞密度, 而根瘤菌作为一类革兰氏阴性细菌, 存在 acyl-HSL 类信号分子, 可以引起群体感应调节, 参与调节共生固氮相关基因的表达。

在本实验室以前的工作中已经发现并鉴定出了 *M.tianshanense* 中的自体诱导物合成酶基因 *mrtI* 和群体感应调控蛋白基因 *mrtR*^[9]。本实验的研究目的是通过构建一株中慢生型天山根瘤菌外源自体诱导物的检测菌株, 通过研究其它根瘤菌自体诱导物对该系统的影响, 进而分析不同根瘤菌之间群体感应系统的相互作用, 对研究不同根瘤菌之间的交互感应有重要意义, 同时有助于了解根瘤菌在豆科植物细胞内的生理行为, 为进一步了解根瘤菌与植物相互作用进行共生固氮这一复杂的生物过程提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒及生长条件 本试验的供试菌株和质粒及其特性见表 1。*R. leguminosarum* (豌豆根瘤菌) 和 *R. trifolii* (三叶草根瘤菌) 用 TY 培养基, 28℃ 培养。*M. tianshanense* (中慢生天山根瘤菌) 用 TY 培养基, 于 28℃ 下培养, Sm 2 μg/ml, Tc 20 μg/ml 以避免 HMZ1 回复突变; *A. tumefaciens* 用 AT 培养基, 于 28℃ 下培养, Tc 2 μg/ml, Spe 100 μg/ml, Gm 100 μg/ml; *E. coli* 用 LB 培养基, 37℃ 下培养, Km 100 μg/ml。

①基金项目: 国家杰出青年基金项目 (30325004) 和国家自然科学基金项目 (30770074, 30570011) 资助。

* 通讯作者 (jun_zhu@njau.edu.cn)

作者简介: 徐翔 (1981—), 男, 江苏苏州人, 硕士研究生, 主要从事根瘤菌固氮研究。E-mail: iamuzzled@hotmail.com

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株与质粒	编号	特性	来源	
菌株	<i>R. leguminosarum</i>	Pi18	野生型	实验室保存
		Pi22	野生型	实验室保存
		Pi24	野生型	实验室保存
	<i>R. trifolii</i>	Tri4	野生型	实验室保存
	<i>M. tianshanense</i>	CCBAU 3306	野生型	文献[10]
		HMZ0	中慢生天山根瘤菌 CCBAU3306 链霉素抗性突变株	实验室保存
		HMZ1	中慢生天山根瘤菌 <i>mrtI</i> 转录融合 <i>lacZ</i> , <i>mrtI</i> 缺失菌株	实验室保存
<i>A. tumefaciens</i>	JZA1	AHL 生物检测菌株KYC55(pJZ372)[TcR](pJZ384)[SpeR](pJZ410)[GmR]	文献[11]	
<i>E. coli</i>	DH5 α	克隆菌株	实验室保存	
	BW20676	结合菌株	实验室保存	
质粒	pBSK	AmpR, 克隆载体	实验室保存	
	pVIK112	<i>lacZ</i> 转录融合载体	文献[12]	
	pHMZ101	pVIK112 中融合 <i>mrtI-lacZ</i> 片断的重组质粒	实验室保存	

1.1.2 试剂和仪器 DNA限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶, 购自TaKaRa公司; PCR产物纯化试剂盒购自Promega公司; X-Gal购自南京赛吉生物技术有限公司; C₁₈反相薄层层析板, 购于Merck公司; 引物合成均由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。o-NITROPHENYL β -D-GALACTOPYRANOSIDE (ONPG), 购于Sigma公司。

1.2 构建检测菌株 HMZ1

1.2.1 *mrtI* 基因的 PCR 扩增及纯化 根据 CCBAU3306 中 *mrtI* 基因的 DNA 序列, 设计一对 PCR 扩增引物, 分别为 5'-GGAATTCTACGCTGCCGTAATC-3' 和 5'-GCTCTAGATTGCCGTAGCCGTC-3'。两个引物分别加了 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切位点, 以便于与经 *EcoRI/XbaI* 双酶切的克隆载体 pBSK 连接。反应条件: 30 个循环, 变性 94°C 1 min, 退火 52°C 1 min, 聚合 72°C 1 min。PCR 产物液体纯化操作按 Promega 试剂盒说明书进行。

1.2.2 *mrtI* PCR 产物及 pBSK 载体的酶切酶连及酶连产物的转化 方法步骤详见参考文献[13]。

1.2.3 pBSK-*mrtI* 及 pVIK112 载体的酶切, 酶连及酶连产物的转化 方法步骤详见参考文献[13]。

1.2.4 pHMZ101 与 BW20676 的转化 方法步骤详见参考文献[13]。

1.2.5 PCR 检测 *mrtI-lacZ* 同源重组菌株 HMZ1 挑取 10 株接合平板中的单菌落, 进行 *mrtI-lacZ* 融合表达菌株的 PCR 验证。设计引物序列为:

mrtI-5'-EcoRI 5'-GGAATTCGGCCTATGCCATGC-3';
lacZ-out 5'-ACGACGACAGTATCGGCCTC-3'。

1.2.6 HMZ1 菌株的AHLs诱导实验 将HMZ1 于 2 ml TY培养基中活化至平稳期, 以 2% 接种量转接于 2 ml TY培养基中, 其中分别加入不同含量的 CCBAU3306 野生型AHL高活性培养上清和HMZ1 自身的上清, 培养HMZ1 至OD₆₀₀约 1.0, 取其中菌液进行 β -半乳糖苷酶活性检测。

1.3 上清活性检测

在野外从豌豆、大豆、三叶草及苜蓿等植物上采集根瘤菌, 获取上清并进行检测。将有诱导活性的根瘤菌制备上清, 分别以 0%、0.3%、1%、3%、10% 的浓度诱导 HMZ1, 具体操作按照文献[14-15]进行。

1.4 薄层层析

具体操作按照文献[16]进行。

2 结果与分析

2.1 HMZ1 的 AHLs 诱导实验

HMZ1 中的 5'*mrtI-lacZ* 在含有高活性 AHLs 分子的 *M. tianshanense* 野生型上清存在的情况下能够被诱导表达, 而已失去 AHL 产生能力的 *mrtI* 基因突变株 HMZ1 的上清则不能诱导 *mrtI* 基因的表达 (图 1), 这说明在 *M. tianshanense* 中 *mrtI* 的表达受其自身产物信号的诱导, 也说明了 *mrtI* 基因是该群体感应的一个调控基因, 同时该菌株丧失合成 AHLs 的能力, 可以作为研究外源 AHLs 对该菌株信号交流的

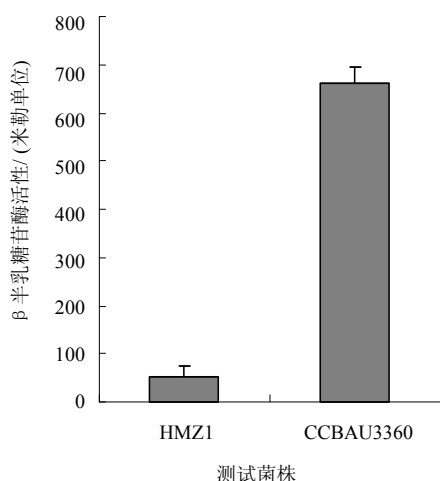


图 1 HMZ1 与野生型上清对 *mrtI* 诱导作用的对比

Fig. 1 Comparison between the effect of HMZ1 and wildtype on *mrtI* expression

材料。

2.2 用 HMZ1 对各根瘤菌上清诱导活性的检测

培养从大豆、豌豆、三叶草及苜蓿等根部分离的根瘤菌 40 株，制备上清。以 10% 的浓度加入 HMZ1 中，培养至 OD₆₀₀ 为 1.0 时显色。共有 4 株根瘤菌上清与 HMZ1 显示较高的反应活性。其中 3 株为豌豆根瘤菌 Pi18、Pi22、Pi24，1 株为三叶草根瘤菌 Tri4 (图 2)。

中慢生型天山根瘤菌中的 *mrtI* 基因可以被上述几种根瘤菌的上清提取物所诱导，而且外源上清量越多，5'*mrtI-lacZ* 被诱导的程度越高。这说明在 *M. tianshanense* 中 *mrtI* 的表达可以受其他根瘤菌 AHLs 信号的诱导，同时并非所有的根瘤菌 AHLs 信号分子都能诱导该基因的表达，说明根瘤菌中 LuxI/LuxR 类群体感应系统间的多样性，这种多样性对根瘤菌间的信号传递以及基因的表达调控具有重要的意义。

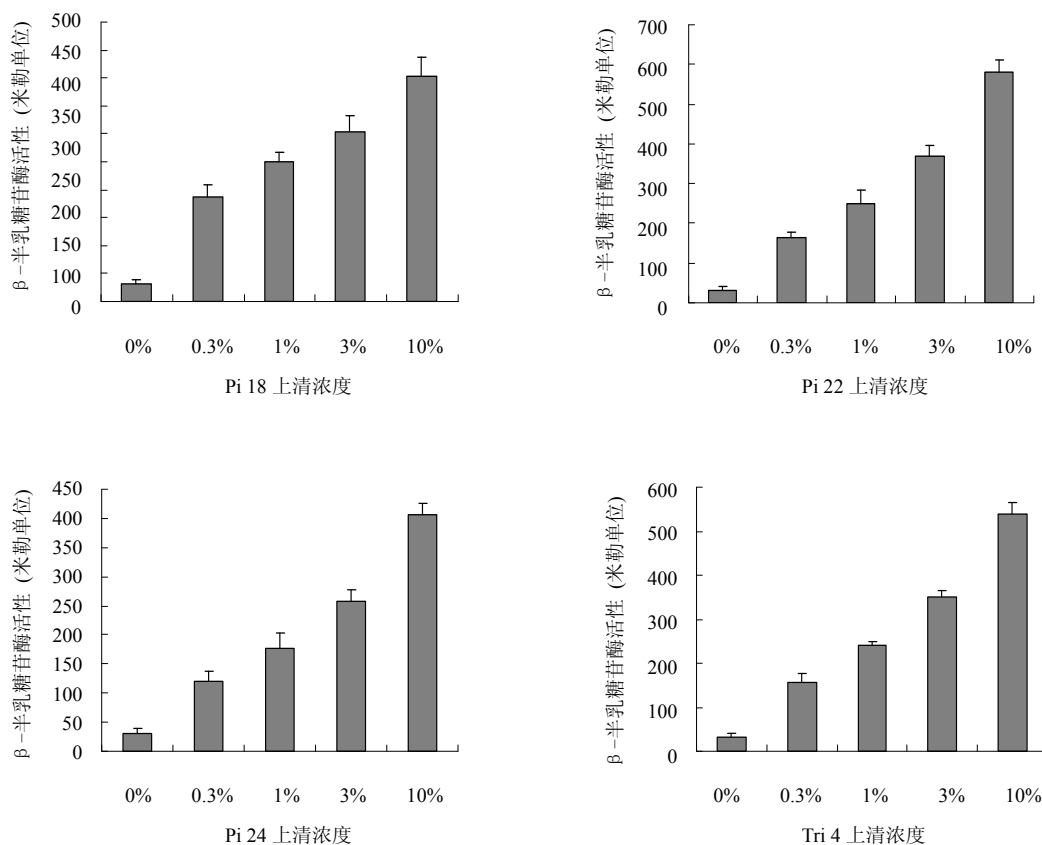


图 2 豌豆根瘤菌 Pi18, Pi22, Pi24, Tri4 上清对 *mrtI* 的诱导作用

Fig. 2 Effect of supernatant from Pi18, Pi22, Pi24 and Tri4 on *mrtI*

2.3 *M. tianshanense* 与 Pi18、Pi22、Pi24、Tri4 的 AHL 分子 TLC 对比试验

为了进一步研究这几种根瘤菌产生的 AHLs 对 *M. tianshanense* 的影响, 对其产生的 AHLs 进行了 TLC 分析。如图 3 所示, *M. tianshanense* 可以产生 5 种 AHL 分子, 上述几株能与其进行信号交流的根瘤菌分别产生 1 ~ 4 种迁移率与 *M. tianshanense* 相同的 AHL 分子, 可初步判定为相同的自体诱导物, 但最终确定应依据结构分析的结果。以上结果说明, 不同属的根瘤菌中可能使用相同的 AHLs 分子进行信号传递, 也解释了为什么上述几株根瘤菌可以诱导 *M. tianshanense* 的 *mrtI* 基因表达。



1:CCBAU 3306; 2:Pi18; 3:Pi22; 4:Pi24; 5:Tri4

图 3 各菌株 AI 的反相薄层层析

Fig. 3 TLC analysis of autoinducers synthesised by the strains

3 讨论

本实验构建了 5' *mrtI-lacZ* 融合表达菌株 HMZ1, 通过对 HMZ1 中 *mrtI* 的报告基因 *lacZ* 表达活性的检测, 发现 *mrtI* 基因在 *M. tianshanense mrtR/I* 群体感应中起着调控作用, 并且通过对多种根瘤菌上清的检测发现了 3 株豌豆根瘤菌和 1 株三叶草根瘤菌对其有诱导作用。TLC 的结果则显示这几种根瘤菌可能通过产生相同的 AHL 分子进行信号交流。可以初步推断在不同属根瘤菌中存在相同的 AI 分子, 而且不同根瘤菌群体感应系统间存在着分子对话的现象, 而以前对细菌群体感应的认识在 AI-2 型群体感应系统间由于信号分子的保守性强, 因此在不同菌株间普遍存在相互的分

子对话, 对 AI-1 (AHLs) 信号系统, 由于信号分子的多样性, 因此相关的报道较少, 而相关的研究对阐明细菌在自然条件下与环境中不同细菌间的相互交流具有重要的意义。在过去对根瘤菌群体感应的研究中多是集中在该信号系统对根瘤菌侵染植物及结瘤能力的影响上, 而本实验说明根瘤菌之间也存在着相互间的影响, 这对进一步研究野生条件下各种根瘤菌如何实现种间的交流, 并与宿主植物形成共生固氮体系有重要的意义。

参考文献:

- [1] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, 55: 165-199
- [2] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulator. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 269-275
- [3] 周玥, 刘小锦, 朱晨光, 孙明, 喻子牛. 细菌中群体感应调节系统. *微生物学报*, 2004, 44 (1): 122-126
- [4] Mok KC, Wingreen NS, Bassler BL. *Vibrio harveyi* quorum sensing: A coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *Embo. J.*, 2003, 22(4): 870-881
- [5] Hardman AM, Stewart GS, Williams P. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 1998, 74: 199-210
- [6] 王平, 冯新梅, 李阜棣. 发光酶基因标记的华葵根瘤菌 JS5A16L 在紫云英根圈的定殖动态. *土壤学报*, 2001, 38(2): 255-270
- [7] 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用. *土壤*, 2003, 35(1): 18-21
- [8] Zhou JB, Li SX, Chen ZJ. Soil microbial biomass nitrogen and its relationship to uptake of nitrogen by plants. *Pedosphere*, 2002, 12(3): 251-256
- [9] Zheng HM, Zhong ZT, Lai X, Chen WX, Li SP, Zhu J. A LuxR/LuxI-type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (5): 1943-1949
- [10] Chen W, Wang E, Wang S, Li Y, Chen X, Li Y. Characteristics of rhizobium *tianshanense* sp. nov. a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, 45: 153-159
- [11] Zhu J, Chai YR, Zhong ZT, Li SP, Winans SC. *Agrobacterium* bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: Detection of autoindu-

- cers in *Mesorhizobium huakuii*. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69: 6949–6953
- [12] Kalogeraki VS, Winans SC. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. Gene, 1997, 188: 69–75
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [14] Fuqua WC, Winans SC. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. J. Bacteriol., 1994, 176: 2796–2806
- [15] Miller J. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972
- [16] Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Jr Cronan JE, Rinehart KL, Farrand SK. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 6036–6041

On Foreign AHL's Effect on Quorum Sensing System of *M. tianshanesne*

XU Xiang, ZHENG Hui-ming, DU Han-chun, WANG Yang, ZHONG Zeng-tao, ZHU Jun
(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: Quorum sensing is a mechanism used by single-cell bacteria to monitor their population density and control a variety of physiological functions in a cell-density-dependent manner. We constructed an 5' *mrtI-lacZ* (the *mrtI* is the AHL production gene in *M.tianshanesne*) transcriptional fusion strains. We found the supernatant of three strains which were got from pea and one strain which got from clover can induce the *mrtI-lacZ* expression. We also found the more the supernatant was the stronger the *lacZ* expressed. The TLC experiment showed that their AIs maybe have the same structure. This study showed the interaction between strains with same function and also paved the way of further studying the relationship between quorum sensing and symbiotic nitrogen fixation of the *M. tianshanesne* strains.

Key words: Quorum sensing, AHLs, *M.tianshanesne*