

中慢生型天山根瘤菌中自体诱导物分子结构的鉴定^①

赵家星¹, 杨梦华¹, 曹慧娟¹, 周 蕾², 杨瑞馥², 钟增涛^{1*}, 朱 军¹

(1 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; 2 中国军事医学科学院微生物与流行病所, 北京 100071)

Identification of Acyl-Homoserine Lactone Autoinducer Molecules in Mesorhizobium Tianshanense

ZHAO Jia-xing¹, YANG Meng-hua¹, CAO Hui-juan¹, ZHOU Lei², YANG Rui-fu², ZHONG Zeng-tao¹, ZHU Jun¹

(1 College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

摘 要: 通过用乙酸乙酯分别对天山根瘤菌 CCBAU3306 培养物上清液中自体诱导物分子进行抽提、浓缩, 并采用液质联用对自体诱导物分子进行结构分析, 最终获得该根瘤菌所产生酰基高丝氨酸内酯类信号分子的结构, 并采用纯品进行活性的比较, 发现调控蛋白与纯品结合后具有生物活性, 能与目的 DNA 片断结合, 证明了该结构的准确性。

关键词: 群体感应; 中慢生型天山根瘤菌; 液质联用; 结构测定

中图分类号: Q933

许多与植物共生的细菌都是通过一种依赖于细胞密度的方式来调控特定基因的表达, 这种调控方式被称之为群体感应 (quorum sensing) [1]。酰基高丝氨酸内酯类化合物 (acylated homoserine lactone, AHL) 作为革兰氏阴性细菌群体感应调控中普遍存在的信号分子 [2], 其在细胞中的浓度随着细胞密度的增加而增加, 当积累到阈值浓度时就能够诱导特定基因的表达 [3]。目前已经鉴定出的 AHL 合成酶有 3 种类型, 分别是 LuxI, LuxM 以及 HtdS [4]。AHLs 由一个可变的乙酰基链尾部与一个稳定的高丝氨酸内酯头部相连, 乙酰基链长度为 4~18 个碳, 其第三个碳上的氢常被羟氧基或氧基取代, 另一个改变是在乙酰链上存在双键。目前发现最长的乙酰基链是由苜蓿中华根瘤菌合成的带 18 个碳的 AHLs [5]。

氮是植物生长所需的重要营养物质, 而根瘤菌能在豆科植物根部形成根瘤, 或者定殖于部分非豆科植物根部, 从而固定空气中的分子氮, 与植物建立互惠的共生关系 [6-7]。根瘤的形成是一个复杂的信号交换过程, 群体感应参与调节共生固氮相关基因的表达 [8], 因而发挥着重要的作用, 但是目前对于中慢生型根瘤菌群体感应的研究报导却很少。本实验室前期实验对不同中慢生型天

山根瘤菌群体感应中自体诱导物活性和种类进行研究, 发现差异较大, 为进一步阐明同属不同种根瘤菌间群体感应系统的多样性, 本研究通过采用液质联用的方法, 以酰基高丝氨酸内酯环的特征碎片峰 m/z 102 对高效液相分离出组份中的酰基高丝氨酸内酯类信号分子进行二维质谱分析, 根据不同类型酰基高丝氨酸内酯类化合物的结构特点及 $[M+H]^+$ 推算出各种信号分子的结构, 并利用纯品通过凝胶阻滞分析证明了该结构的生物学功能, 研究为进一步阐明自体诱导物合成酶多样性与信号分子多样性间相互关系及不同菌株间信号系统间分子对话具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及生长条件 表 1 为本试验所使用

表 1 供试菌株

菌株	特性	来源
天山根瘤菌 CCBAU3306	野生型	中国农业大学
JZA1	自体诱导物检测菌株	本实验室保存
R10(pCF218)	阳性对照菌株	本实验室保存

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870065, 30800013) 资助。

* 通讯作者 (ztzhong@njau.edu.cn)

作者简介: 赵家星 (1984—), 男, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事根瘤菌群体感应研究。E-mail: 2006116084@njau.edu.cn

的菌株特性。根瘤菌在 TY 培养基中 28℃ 培养, JZA1、R10 分别在 LB 和 AT 培养基中 28℃ 培养。

1.1.2 试剂和仪器 邻硝基苯-β-D-半乳糖苷 (O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside, ONPG), 异丙基-β-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactosid, IPTG), 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, X-Gal) 购于 Sigma 公司; C₁₈ 反相薄层层析板购于 Merck 公司。高效液质联用仪为 Waters micromass 公司生产, 型号为 quattro。

1.2 方法

1.2.1 自体诱导物活性检测 (β-半乳糖苷酶法) 按参考文献[9-10]的方法进行。

1.2.2 C₁₈ 反相薄层层析 (thin-layer chromatography, TLC) 按参考文献[11]的方法使用 Whatman 的反向层析进行。

1.2.3 自体诱导物缺失突变株的筛选 按参考文献[11]的方法进行。

1.2.4 AHL 结构的质谱分析 将待测菌株的培养上清液用二氯甲烷萃取, 真空旋转蒸发后溶于适量二氯甲烷中, 用于电喷雾电离质谱 (electrospray ionization mass spectra, ESI MS/MS) 分析。

1.2.5 DNA 凝胶阻滞分析 (gel retardation assay)

通过 PCR 的方法扩增得到需要分析的 DNA 片段 (含有或不含有 MrtR box), 并在扩增过程中加入带有 α-P³² 同位素标记的 dATP, 可以得到带有同位素标记的 DNA 片段。把带有标记的 DNA 片段、纯化的 MrtR 蛋白以及 AI 分子以适当比例混合后, 加入 1/10 体积的结合缓冲液, 用超纯水把反应体系补充到适当体积, 于 30℃ 作用 30 min 后, 反应体系中加入甘油至终浓度为 5%, 然后用低浓度 (6%) 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 中慢生天山根瘤菌自体诱导物信号分子的测定

为进一步揭示不同菌株间信号分子的差异, 通过液质联用的方法对天山根瘤菌模式菌株 CCBAU3306 产生的信号分子结构进行了快速测定。因为 AHLs 类信号分子具有固定的高丝氨酸内酯环, 因此在质谱中会形成特征的 m/z 102 的碎片峰^[12] (图 1a), 以此为母离子进行电喷雾电离质谱, 能对样品中的 AHLs 分子进行质谱分析。

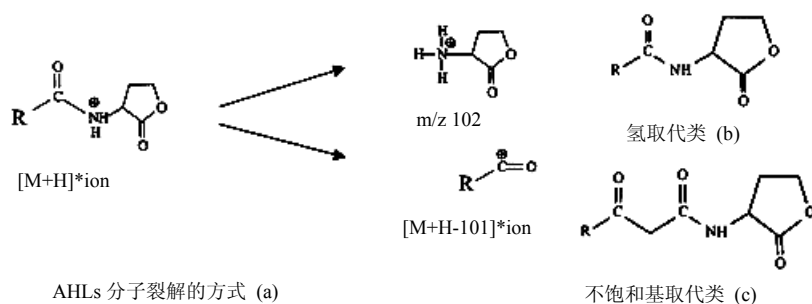


图 1 AHLs 分子裂解的方式 (a) 和分子结构示意图 (b, c)

因为 AHLs 分子的可变端为烃链, 而酰基高丝氨酸内酯基团是稳定的, 根据这一现象根据分子离子峰的数值可以得出以下公式计算 AHLs 分子的分子式:

氢取代类: $n = \frac{m/z-1-171}{28}$, n 为自然数; 羟基取代

类: $n = \frac{m/z-1-187}{28}$, n 为自然数; 不饱和羰基类:

$n = \frac{m/z-1-185}{28}$, n 为自然数。

以氢取代为例, $m/z-1$ 为检测的信号分子的分子量, R 为烷基取代, 其基本的氨基高丝氨酸内酯

基团的分子量是 100 (如图 1b), RCO-基团来源于脂肪酸合成途径, 该酰基链为偶数个碳, 最简单的是 C₄-HSL, 分子量是 171, 其他的分子与它的差别在于 (-CH₂-CH₂-)_n 基团的数量, 因此用分子量减去 C₄-HSL 的基本分子量 171, 氢取代类的差别在于 (-CH₂-CH₂-)_n 基团的数量, 该基团的分子量为 28, 按公式得出的 n 值的两倍即为比 C₄-HSL 多的碳原子数, 加 4 后即为该分子的碳链长度, 也就可知该类信号分子的分子式。同理在另两类信号分子中 (如图 1c) 用分子量分别减去最基本信号分子的分

子量, 再按 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$ 基团的数量的差别进行计算可以分别得出各自的分子式。根据高效液质联用的结果(图 2)可以得出天山根瘤菌 CCBAU3306

所产生自体诱导物分子式为 $3\text{OH}-\text{C}_{12}\text{-HSL}$ 和 $3\text{OH}-\text{C}_{14}\text{-HSL}$ (图 3a)。

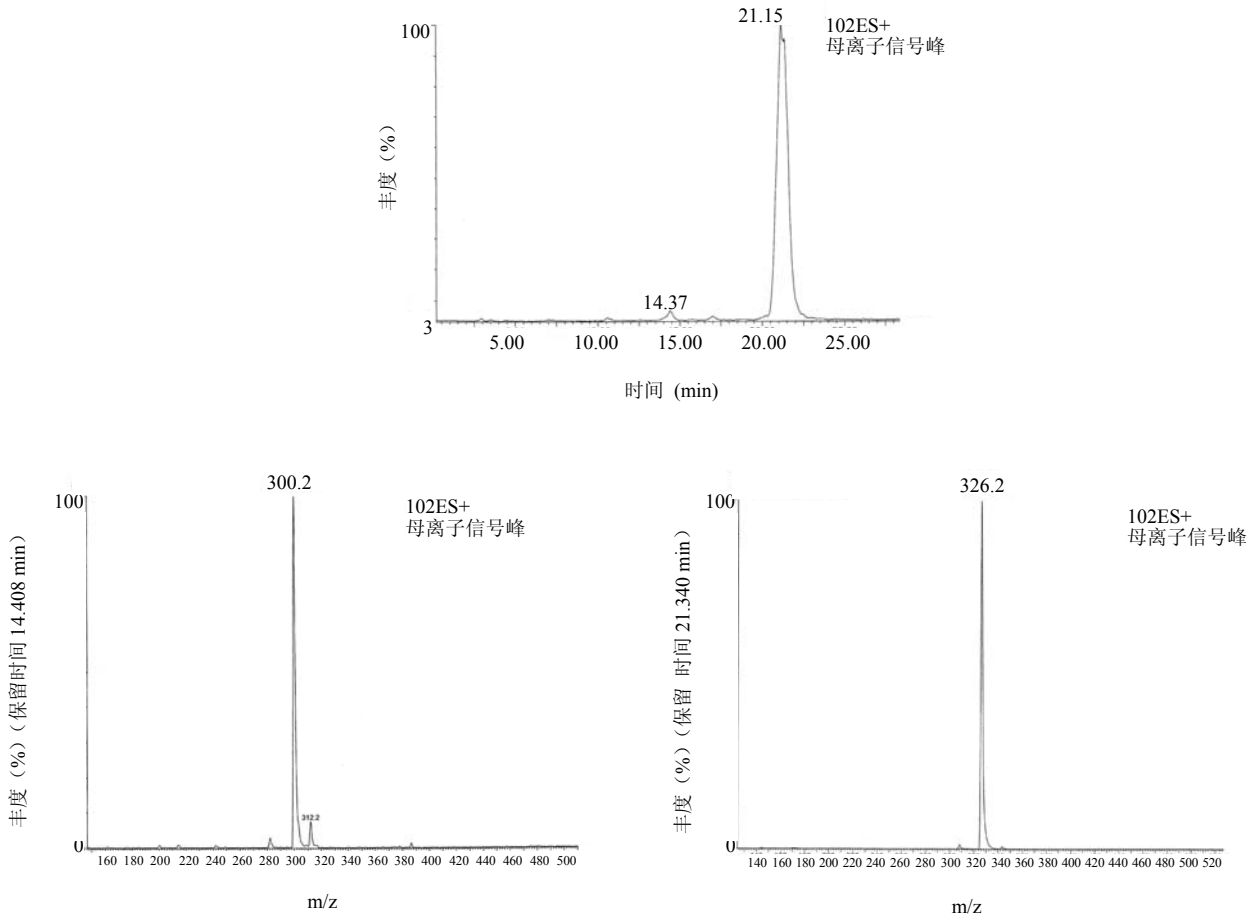


图 2 天山根瘤菌 CCBAU3306 自体诱导物物质联用检测结果

Fig.2 Detections of AHLs produced by *Mesorhizobium tianshanense* CCBAU3306 with HPLC-mass spectrometer

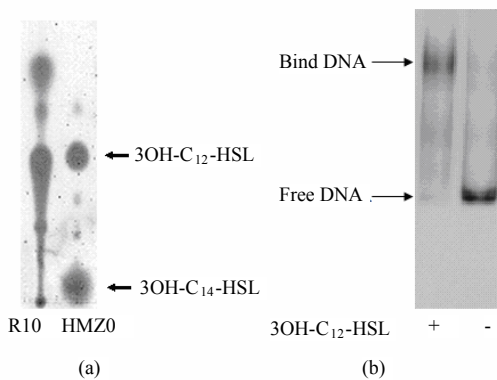


图 3 天山根瘤菌 CCBAU3306 自体诱导物结构及功能验证

2.2 中慢生天山根瘤菌自体诱导物信号分子活性的检测

为进一步验证测定结果的准确性, 采用标样进行生物活性检测。因为群体感应系统的调控蛋白能与其自体诱导物合成酶合成的信号分子结合, 形成二聚体后具有生物活性, 并与目的基因片段发生结合, 所以用合成的 $3\text{OH}-\text{C}_{12}\text{-HSL}$ 与该根瘤菌群体感应系统的调控蛋白 MrtR 作用, 通过凝胶阻滞分析发现在加入标准品后 MrtR 能与目的片段结合(图 3b), 因此证明该信号分子能与调控蛋白作用, 该结构是其合成酶合成的一种 AHLs 类信号分子。

3 讨论

本研究建立了一种快速的检测方法确定细菌产生 AHLs 类信号分子分子式的方法, 这种群体感应系统信号分子的结构、合成酶基因和调控基因存在多样性,

而且合成酶的专一性不高, 往往一种酶能合成几种不同结构的 AHL 分子^[13], 在不同的细菌中调控的生理功能各不相同, 具有相对的独立性, 但在特定的情况下例如当土壤中两种不同细菌产生相同的 AHL 分子时也能产生信号间分子对话, 因此对 AI-1 型群体感应系统的研究除了对相关基因进行分析, 对其产生的自体诱导物分子结构进行分析也十分重要, 这对我们了解 AI-1 型信号途径的多样性具有重要的意义。在一般情况下对有机化合物进行结构分析首先需要对样品的组分进行分离、纯化, 在化合物含量较低的情况下很难得到符合仪器分析所需含量的化合物纯品, 而 AHLs 作为细菌的信号分子, 其诱导细菌活性的浓度很低 (1 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$), 同时一种细菌又往往产生多种 AHLs 信号分子, 其结构上的相似性又增加了分离纯化的难度, 因此用传统的分离及分析方法很难得到一种信号分子结构。

电喷雾电离质谱是通过测量样品组分的质量电荷比 (M/Z) 检测样品组分的分子量。由于电喷雾电离质谱对于高分子化合物的测定可以产生多电荷峰, 与传统的质谱相比扩大了检测的分子质量范围, 同时提高了仪器的灵敏度, 在皮摩尔数量级的水平或更少的样品检测中, 当分辨率为 1000 时可达 0.005% 的精度。由于 AHLs 类信号分子都具有稳定的酰基高丝氨酸内酯环, 能形成特征的 m/z 为 102 的碎片峰, 通过标样确定该母离子峰就可以专一性地检测液相色谱各组分中的 AHLs 分子, 而其他杂质对检测结果不会产生干扰, 这样在液相色谱图中只显示样品中各种 AHLs 的分离峰, 大大简化了分离纯化的步骤, 再利用 AHLs 可变乙酰基链在长度排列上的规律, 可以归纳出计算公式, 根据每种 AHLs 分离峰在质谱仪中所测定的分子量大小就可以快速得到样品中各种 AHLs 的分子式和结构类型。该方法的建立能方便对各种细菌所产生 AHLs 分子进行分析, 推动对该种群体感应系统全面了解。

参考文献:

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 269-275
- [2] Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25: 365-404
- [3] Zhu J, Winans SC. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 4832-4837
- [4] Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AM, Salmond GP, Williams P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv. Microb. Physiol.*, 2001, 45: 99-270
- [5] Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, Gonzalez JE. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.*, 2002, 184: 5686-5695
- [6] Duan YH, Zhang YL, Shen QR, Wang SW. Nitrate effect on rice growth and nitrogen absorption and assimilation at different growth stages. *Pedosphere*, 2006, 16(6): 707-717
- [7] 杜寒春, 郑会明, 周晶, 曹慧, 沈标, 娄无忌, 钟增涛. 紫云英-小麦混作体系中氮素转移对小麦生长的促进作用. *土壤学报*, 2006, 43(6): 1043-1046
- [8] Gonzalez JE, Marketon MM. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mo. Biol. Rev.*, 2003, 67: 574-592
- [9] Zhu J, Chai Y, Zhong Z, Li S, Winans SC. Agrobacterium bioassay strain for ultrasensitive detection of N-acylhomoserine lactone-type quorum-sensing molecules: Detection of autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 6949-6953
- [10] 钟增涛, 周晶, 李路, 高轶静, 朱军. 利用高效检测菌株对中慢生根瘤菌及红壤中自体诱导物的检测. *土壤*, 2005, 37(1): 62-64
- [11] Gao Y, Zhong Z, Sun K, Wang H, Zhu J. The quorum-sensing system in a plant bacterium *Mesorhizobium huakuii* affects growth rate and symbiotic nodulation. *Plant Soil*, 2006, 286: 53-60
- [12] Morin D, Grasland B, Karine VR, Dufau C, Haras D. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *Journal of Chromatography*, 2003, 1002: 79-92
- [13] Zheng H, Zhong Z, Lai X, Chen W, Li S, 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