

异源 *nifA* 基因对苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体的互补分析

姚振华^{①*} 田哲贤^{②*} 戴小密^① Anke Becker^③ 李健^② 严海芹^② 肖琰^②
朱家璧^① 俞冠翘^① Silvia Rüberg^③ 王忆平^② 邹华松^{①†}

(① 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032; ② 北京大学生命科学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871; ③ Institute for Genome Research, CeBiTec, Bielefeld University, Postfach 100131, D-33615 33501 Bielefeld, Germany. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: hszhou@sibs.ac.cn)

摘要 为深入研究苜蓿中华根瘤菌 *NifA* 的特性, 分别用组成型表达的慢生型大豆根瘤菌和紫云英根瘤菌的 *nifA* 基因互补苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体, 观察其共生表型. 结果表明, 慢生型大豆根瘤菌和紫云英根瘤菌 *nifA* 基因不能互补苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体的共生表型. 以苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体为遗传背景, 利用全基因组微阵列实验比较分析引入异源 *nifA* 基因后产生的基因表达谱的变化. 结果显示, 苜蓿中华根瘤菌自身 *NifA* 蛋白引起 238 个基因的表达发生变化. 这些表达差异的基因分属共生、能量和中心代谢、持家、细胞结构与运输等生物学功能组. 慢生型大豆根瘤菌、紫云英根瘤菌和阴沟肠杆菌的 *NifA* 蛋白分别引起了 20, 7 和 9 个基因的表达发生变化. 这些基因主要是固氮相关基因, 但差异不及苜蓿中华根瘤菌 *NifA* 互补菌明显. 以苜蓿中华根瘤菌 *nifH* 启动子与 *lacZ* 融合基因为报道基因, 研究 *nifH* 的表达. 结果指出, 慢生型大豆根瘤菌和紫云英根瘤菌的 *NifA* 蛋白只能部分激活苜蓿中华根瘤菌 *nifH* 的表达, 激活水平分别为苜蓿中华根瘤菌 *NifA* 蛋白激活率的 70% 和 50%, 与微阵列实验结果相符.

关键词 *Sinorhizobium meliloti* *NifA* 基因表达 基因组微阵列

根瘤菌可以在豆科植物的根部引发一种特殊的器官——根瘤, 并与宿主植物之间建立共生关系. 在形成根瘤的过程中, 细菌通过侵染线进入正在发育的根瘤后, 进一步分化形成类菌体^[1-3]. 成熟的类菌体可以把气态的氮还原成氨, 并提供给植物. 相应的, 植物以二羧酸的形式向类菌体提供碳源和能量^[4]. 在共生固氮过程中, 氮源虽然是由根瘤菌产生的, 根瘤菌和宿主植物之间的氮交换却可以由植物进行主动的调节, 植物可以向类菌体提供过剩的氨基酸, 关闭类菌体继续固氮的行为^[5].

在所有的根瘤菌中, *nifA* 基因都是固氮的正调节基因, 激活参与固氮过程的固氮酶结构基因(nitrogenase synthesis, *nif*)和微氧呼吸基因(microoxic respiration, *fix*)^[6]. *nifA* 基因突变以后, 突变体在宿主植物根部引发大量的不能固氮的白色根瘤^[7,8]. 此外, 一些与固氮无直接关系的基因也受 *nifA* 基因的调节, 如苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*, *Sm*)的 *nfe* 和 *mos* 基因^[6], 慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*, *Bj*)的 *nrgABC* 基因^[9]. *Sm nifA* 基因的表达

受双组分调控系统 FixL/FixJ 的调节, 并通过这个双组分系统感受低氧环境条件^[10]. 但在 *B. japonicum* 中 *nifA* 基因的表达却不受 FixL/FixJ 的影响^[11]. 这些结果表明, *nifA* 基因的调节功能不仅仅局限于固氮基因, 不同根瘤菌 *nifA* 基因的表达存在一定的差异.

本室以前的研究表明, 自生固氮菌阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*, *Ec*) 的 *NifA* 蛋白可以在大肠杆菌内激活 *S. meliloti nifH* 基因启动子, 但不能恢复 *Sm nifA* 突变体的固氮能力^[12]. 近来还发现, *S. meliloti* 的 *nifA* 基因突变以后, 有多达 601 个基因的表达发生变化, 几乎占了全基因组的十分之一^[13]. 本研究在 *Sm nifA* 突变体中分别引入组成型表达的 *S. meliloti*, *B. japonicum*, *E. cloacae* 和紫云英根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*, *Mh*) *nifA* 基因, 检测引入异源 *NifA* 后 *Sm nifA* 突变体共生表型的变化, 重点研究了由此而产生的基因表达差异.

1 材料和方法

(i) 菌株与质粒. 本研究所使用的菌株和质粒见表 1. 大肠杆菌在 Luria-Bertani (LB) 培养基中 37°C

表 1 本研究所使用的菌株和质粒

质粒和菌株	特点	来源
菌株		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
Rm1021	野生型, Sm ^r	[14]
SmY	来源于 Rm1021 的 <i>nifA</i> 基因突变体(<i>nifA</i> ::Tn5), Nm ^r Sm ^r	[12]
SmY/pSAWB5	组成型表达苜蓿中华根瘤菌 <i>nifA</i> 基因的 SmY, Nm ^r Sm ^r Tc ^r	[12]
SmY/pEAWB5	组成型表达阴沟肠杆菌 <i>nifA</i> 基因的 SmY, Nm ^r Sm ^r Tc ^r	[12]
SmY/pRJ7556	组成型表达慢生型大豆根瘤菌 <i>nifA</i> 基因的 SmY, Nm ^r Sm ^r Sp ^r	本研究
SmY/pMAWB5	组成型表达紫云英根瘤菌 <i>nifA</i> 基因的 SmY, Nm ^r Sm ^r Tc ^r	本研究
<i>E. coli</i>		
DH5α	F' <i>minrecA</i> , Φ80d <i>LacZ</i> , Δ <i>M15</i>	本室保存
JM109	F' <i>recA1</i> , <i>sup44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>)	本室保存
YMC12	<i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>fnr</i> ⁺ , <i>crp</i> ⁺ , <i>gyr</i> ⁺	[15]
质粒		
pRK2013	帮助质粒, Km ^r	[16]
pWB5	广宿主质粒载体, Tc ^r Km ^r	[17]
pSAWB5	携带苜蓿中华根瘤菌 <i>nifA</i> 基因的 pWB5 重组质粒, Tc ^r	[12]
pEAWB5	携带阴沟肠杆菌 <i>nifA</i> 基因的 pWB5 重组质粒, Tc ^r	[12]
pMAWB5	携带紫云英根瘤菌 <i>nifA</i> 基因的 pWB5 重组质粒, Tc ^r	本研究
pRJ7556	携带慢生型大豆根瘤菌 <i>nifA</i> 基因的 pWB5 重组质粒, Tc ^r Km ^r	[11]
pHZ184	携带苜蓿中华根瘤菌 <i>nifHp-lacZ</i> 的 pACYC184 重组质粒, Cm ^r	[12]

培养, 根瘤菌是在LB/MC培养基中 28℃培养^[18]. 抗生素的使用浓度为: 链霉素, 200 μg/mL; 卡那霉素, 25 μg/mL; 新霉素, 50 μg/mL; 氯霉素, 10 μg/mL; 四环素, 10 μg/mL.

(ii) 质粒的构建. 根据 *M. huakuii* 的 *nifA* 基因序列, 设计特异性引物 5'-taggatccccgtgtgcgccgaggtac-3' 和 5'-tacaagcttcagctgccatcgctcggtc-3', 从 *M. huakuii* 的基因组中扩增 *nifA* 基因的全长序列. 将 PCR 产物测序后, 克隆到载体 pWB5 中形成重组质粒 pMAWB5.

(iii) 组成型*nifA*基因在大肠杆菌和根瘤菌中的活力检测. 用CaCl₂ 转化方法, 把含Sm P_{nifH-lacZ}报告基因的融合子质粒pHZ184 转入大肠杆菌YMC12, 形成YMC12/pHZ184^[19]. 用三亲本接合方法先把pHZ184 转入*S. meliloti*的*nifA*突变体SmY, 形成SmY/pHZ184. 再将携带*nifA*基因的质粒pSAWB5, pMAWB5, pRJ7556 和pEAWB5 分别转入YMC12/pHZ184 和SmY/pHZ184 中, 形成同时携带Sm P_{nifH-lacZ}和组成型表达*nifA*基因的菌株. 大肠杆菌YMC12 在LB液体培养基中培养后, 按Miller^[20]方法测定β-半乳糖苷酶活性. 根瘤菌中β-半乳糖苷酶活性在根瘤中测定. 用 0.1% HgCl₂ 处理过的苜蓿种子在根瘤菌培养液中浸润 30 min, 然后种在无菌的蛭石-

珍珠岩(2:1)混合物中. 苜蓿在人工气候室生长, 每隔 2 d浇一次无氮营养液. 30 d后, 摘取根瘤, 测定β-半乳糖苷酶活性^[12]. β-半乳糖苷酶活性高低反应了组成型*nifA*基因的活力强弱.

(iv) 固氮酶活性测定. 参照杨成涛等人^[12]的方法.

(v) 基因组微阵列实验. 用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Gemany)分离纯化根瘤总 RNA. 在液氮中, 磨碎 0.3 g 冻存的根瘤, 加入 4.5 mL RLT 缓冲液使根瘤菌进一步裂解, 用酚-氯仿反复抽提后, 加入等体积异丙醇沉淀 RNA. RNA 中污染的 DNA 用 DNase I 处理并通过 RNeasy Mini Kit 进行纯化. 探针的标记和杂交按文献[13]进行. 用 GenePix Pro 4.0 (Axon, America)软件获得微阵列杂交图像, 并进行杂交点信号定量. 用 TIGR ExpressConverter 1.4 软件把 GenePix 数据(gpr 格式文件)转换成 TIGR MultiExperiment Viewer 文件格式(mev). 之后, 利用 TIGR MIDAS 2.17 软件进行 lowest fit 归一化处理. MIDAS 软件的信噪比参数设为 2.0, 这样, 那些去除背景后的信号强度低于背景信号的点就不再进行分析. 计算 LOWESS 因子的 smooth 参数设为 33%. 归一化之后的信号强度比值的对数值 log₂Ratio 用 TIGR MEV

2.2 软件计算得到. 每个实验组中, 将每个基因在 3 个微阵列的 9 个数据合并在一起. 缺失 3 或 3 个以上的数据的基因不再进一步分析. 利用 Excel-Addin SAM 1.21 软件, 筛选出表达显著上调或下调的基因, 在分析过程中回应格式(response format)设为 'one class' 以及 delta 值设为 1.2. 当 $\log_2\text{Ratio}$ 不小于 1.00 或不大于 -1.00 时, 基因的表达算作有显著的差异^[13].

2 结果和讨论

2.1 *B. japonicum* 和 *M. huakuii* 异源 *nifA* 基因对 *S. meliloti nifA* 突变体的互补

自生固氮菌 *E. cloacae* 的 *nifA* 基因已被证明不能互补 *Sm nifA* 突变体 SmY 的结瘤和固氮表型, 可能是由于 *E. cloacae* 和 *S. meliloti* NifA 蛋白结构不同所致^[12]. 本研究选用两种共生固氮菌, 即 *B. japonicum* 和 *M. huakuii* 的 *nifA* 基因, 把带有组成型表达的这两种 *nifA* 基因的质粒 pRJ7556 和 pMAWB5 分别引入 SmY 后, 互补菌 SmY/pRJ7556 和 SmY/pMAWB5 的共生表型与 SmY 没有明显区别, 在苜蓿根部引发不能固氮的白色根瘤, 植株生长较弱, 叶片发黄, 呈明显的缺氮状态, 根瘤中检测不到固氮酶的活性. 而携带 *Sm nifA* 基因的互补菌 SmY/pSAWB5 引发苜蓿植物产生具有固氮能力的红色根瘤, 固氮酶活力恢复到野生型的 75% (图 1).

2.2 异源 *nifA* 基因互补的 *S. meliloti nifA* 突变体的基因表达谱分析

为了解 *S. meliloti*, *B. japonicum*, *M. huakuii* 和 *E. cloacae* NifA 蛋白对 *Sm nifA* 突变体的基因表达的影响, 以 *S. meliloti nifA* 突变体 SmY 作为对照, 通过基因微阵列实验比较互补菌 SmY/pSAWB5, SmY/pRJ7556, SmY/pMAWB5 和 SmY/pEAWB 的基因表达谱.

基因微阵列实验结果表明, 在 SmY/pSAWB5 中, 有 49 个基因的表达明显增强, 189 个基因的表达减弱. 在总共 238 个差异表达的基因中, 有 132 个为未知基因, 占有差异表达基因的 55% (结果未显示). 已知的 106 个基因分别涉及共生、能量和中心代谢、持家、细胞结构与运输等生物学功能组. 在所有差异表达的基因中, 共生相关基因的表达水平差异最大, 包括受 *nifA* 基因调节的 *nifHDKE*, *fixABCX*, *nifN*, *nifB*, *fdxB* 和 *nifX*, 它们的表达水平可增强 10 倍, 而具有电子传递功能的固氮基因 *fixG*, *fixP1Q1*, *fixN1*, *fixK1*, *fixK2* 和 *fixT2* 的表达水平却是降低的. 此外, 参与结瘤因子合成与分泌的 *nod* 基因的表达水平也发生了变化. *nodQ2*, *nodH*, *nodF* 和 *nolF* 的表达增强, 而 *nodL* 和 *noeB* 的表达水平降低 (表 2). 涉及其他生物学功能的差异表达基因绝大多数在 SmY/pSAWB5 中表达水平降低. 如参与能量和中心代谢的 27 个表达发

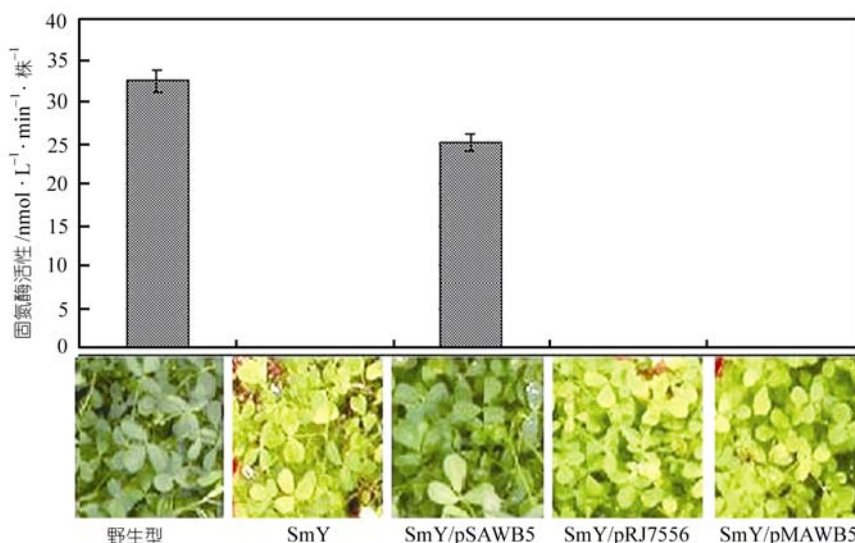


图1 *Bradyrhizobium japonicum* 和 *Mesorhizobium huakuii* *nifA* 基因对 *Sinorhizobium meliloti nifA* 突变体的互补

表 2 不同来源 NifA 蛋白引起的苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体根瘤细菌中差异表达的基因

基因序号	基因名称	基因产物	基因表达差异的倍数(log ₂ Ration) ^{a)}			
			SmY/pSAWB5	SmY/pRJ7556	SmY/pMAWB5	SmY/pEAWB5
共生						
sma0825	<i>nifH</i>	固氮酶 Fe 蛋白	-3.6	-2.4	-1.4	-
sma0827	<i>nifD</i>	固氮酶 Fe-Mo α1 链蛋白	-4.1	-2.4	-	-
sma0829	<i>nifK</i>	固氮酶 Fe-Mo β1 链蛋白	-3.8	-2.7	-1.3	-
sma0830	<i>nifE</i>	氧化还原酶蛋白	-1.9	-1.3	-	-
sma0814	<i>nifB</i>	FeMo 辅助合成蛋白	-1.5	-	-	-
sma0831	<i>nifX</i>	固氮蛋白	-4.2	-1.5	-	-
sma0822	<i>fixA</i>	黄素蛋白β1 链	-3.8	-1.4	-2.6	-
sma0819	<i>fixB</i>	黄素蛋白α1 链	-4.2	-1.4	-	-
sma0817	<i>fixC</i>	氧化还原酶蛋白	-3.9	-1.4	-	-
sma0816	<i>fixX</i>	铁氧还蛋白	-3.4	-	-	-
sma0834	<i>fdxB</i>	铁氧还蛋白III	-3.0	-1.8	-1.1	-
sma1220	<i>fixN1</i>	细胞色素氧化酶亚基蛋白	1.0	-	-	-
sma1211	<i>fixG</i>	铁硫膜蛋白	1.2	-	-	-
sma1214	<i>fixQ1</i>	细胞色素氧化酶亚基蛋白 <i>cbb3</i> 同源物	1.2	-	-	-
sma0760	<i>fixT2</i>	电子传递功能蛋白	1.4	-	-	-
sma1213	<i>fixP1</i>	细胞色素 c 血红蛋白	1.4	-	-	-
sma1225	<i>fixK1</i>	转录激活因子	1.6	-	-	-
sma0762	<i>fixK2</i>	转录激活因子	1.5	-	-	-
sma1209	<i>fixI1</i>	铜运输 ATP 酶	1.5	-	-	-
smb21224	<i>nodQ2</i>	硫酸腺苷酰转移酶	-2.0	-	-	-
sma0876	<i>nodF</i>	分泌蛋白	-1.0	-	-	-
sma0864	<i>nodI</i>	膜运输蛋白	-	-	-	-1.3
sma0774	<i>noeB</i>	宿主专化结瘤基因	1.3	-	-	-
sma0852	<i>nodF</i>	乙酰转运蛋白	-2.3	-	-	-
sma0772	<i>nodL</i>	乙酰转移酶	1.4	-	-	-
sma0851	<i>nodH</i>	磺基转移酶	-3.6	-	-	-
能量和中心代谢						
smb20404	smb20404	醛脱氢酶	-3.3	-	-	-
smc00005	<i>fabI1</i>	烯酰 ACP 还原酶 NADH	-1.8	-	-	-
sma0959	sma0959	3-氧酰还原酶	-1.1	-	-	-
sma1236	<i>napA</i>	周质硝酸还原酶	-	-1.2	-	-
smc02282	smc02282	含铜氧化还原酶	1.0	-	-	-
smc00906	smc00906	乙酰转移酶	1.1	-	-	-
sma1450	sma1450	硫解酶	1.6	-	-	-
smb20150	smb20150	肌醇单磷酸酶	1.8	-	-	-
smc03795	<i>leuD</i>	异丙基苹果酸脱水酶	1.1	-	-	-
smc02767	<i>trpF</i>	N-5'-磷酸核糖胺异构酶	1.3	-	-	-
smc04214	<i>cobU</i>	2-苯丙咪唑磷酸磷酸核糖胺转移酶	1.0	-	-	-
smc03231	<i>hemC</i>	胆色素原脱氨基酶	1.1	-	-	-
smc02435	<i>hemK1</i>	甲基转移酶	1.2	-	-	-
smb20079	smb20079	溶血素腺嘌呤环化酶	1.2	-	-	-
sma1184	<i>nosF</i>	铜运输蛋白	1.0	-	-	-
smc03201	<i>bkdAa</i>	2-氧异戊酸脱氢酶 α 亚基	1.4	-	-	-
smc03817	smc03817	糖激酶	1.0	-	-	-
smc01500	<i>smoS</i>	山梨糖醇脱氢酶	1.3	-	-	-
smb21640	<i>paaA</i>	苯乙酸降解蛋白	1.5	-	-	-
sma0002	<i>fdoG</i>	甲酸脱氢酶 α 亚基	1.2	-	-	-
sma1038	sma1038	含铜氧化还原酶	1.2	-	-	-
smc01917	<i>nuoE1</i>	NADH 脱氢酶 I 链 E 蛋白	1.1	-	-	-
smc01915	<i>nuoD1</i>	NADH 脱氢酶 I 链 D 蛋白	1.5	-	-	-
smc01912	<i>nuoA1</i>	NADH 脱氢酶 I 链 A 蛋白	1.7	-	-	-
smc01030	<i>pdhaA</i>	丙酮酸脱氢酶 α 亚基	1.3	-	-	-
smc02651	<i>era</i>	GTP 结合蛋白	1.2	-	-	-

续表 2

基因序号	基因名称	基因产物	基因表达差异的倍数(log ₂ Ration) ^{a)}			
			SmY/pSAWB5	SmY/pRJ7556	SmY/pMAWB5	SmY/pEAWB5
smc04292	<i>cyaF3</i>	鸟苷酸环化酶	1.7	—	—	—
smb20407	<i>hyuB</i>	甲基乙内酰胺酶	—	-1.2	—	—
smb21638	<i>paaC</i>	苯乙酸降解蛋白	—	—	—	1.8
smc02725	<i>trpE</i>	谷氨酰氨基转移酶	—	—	—	-1.4
smb20986	<i>narB</i>	硝酸还原酶大亚基	1.0	—	—	—
结构和适应性						
smc00067	<i>lppA</i>	细胞外膜脂蛋白	1.3	—	—	—
smc00122	<i>pbp</i>	青霉素结合蛋白	1.0	—	—	—
smc01871	<i>ddlB</i>	丙氨酸连接酶 B 蛋白	1.1	—	—	—
smc01867	<i>murC</i>	UDP-N-乙酰胞壁酸-丙氨酸连接酶	1.4	—	—	—
smc01861	<i>murE</i>	UDP-N-乙酰胞壁酸-谷氨酸-2,6-二氨基庚二酸连接酶	1.7	—	—	—
smc00894	<i>kdtA</i>	3-脱氧-D-甘露辛酮糖酸转移酶	1.2	—	—	—
sma1568	<i>cpaF2</i>	鞭毛组装蛋白	1.2	—	—	—
smc01117	<i>rimI</i>	乙酰转移酶	1.2	—	—	—
sma1447	<i>sma1447</i>	跨膜蛋白	1.3	—	—	—
smc04040	<i>smc04040</i>	热激蛋白	1.1	—	—	—
smb21295	<i>smb21295</i>	热激蛋白 hsp20	1.3	—	—	—
smc01860	<i>ftsI</i>	青霉素结合跨膜蛋白	1.8	—	—	—
smc01143	<i>hrcA</i>	热激转录抑制因子	1.2	—	—	—
smc03027	<i>flgB</i>	鞭毛蛋白	1.2	—	—	—
smc03971	<i>mexF2</i>	多药物溢出系统跨膜蛋白	1.6	—	—	—
smc03857	<i>ffh</i>	信号识别小分子	1.4	—	—	—
smc02653	<i>lepB</i>	信号肽 I 跨膜蛋白	1.0	—	—	—
持家功能						
smc01010	<i>thrS</i>	苏氨酸-tRNA 合成酶	1.5	—	—	—
smc00321	<i>truB</i>	假尿苷-tRNA 合成酶β蛋白	1.6	—	—	—
smc02547	<i>pip1</i>	脯氨酸亚氨酶	1.2	—	—	—
smc02652	<i>rnc</i>	RNA 酶 III	1.6	—	—	—
smc02863	<i>recF</i>	DNA 修复蛋白	1.7	—	—	—
smc03967	<i>ruvC</i>	霍利迪连接体限制性核酸内切酶	1.9	—	—	—
smc02908	<i>recR</i>	重组蛋白	1.7	—	—	—
smc03966	<i>ruvA</i>	霍利迪连接体 DNA 解旋酶	1.9	—	—	—
smc02912	<i>nusA</i>	氮吸收蛋白 A	1.2	—	—	—
smc02914	<i>infB</i>	翻译起始因子 IF-2	1.3	—	—	—
smc02796	<i>rho</i>	转录终止因子 Rho	1.5	—	—	—
smb20989	<i>smb20989</i>	材质列的类 Stomatin 蛋白	1.0	—	—	—
smc03242	<i>typA</i>	酪氨酸磷酸化酶 A	1.2	—	—	—
运输功能						
smc01949	<i>livG</i>	支链氨基酸 ABC 转运蛋白	-2.2	—	—	—
sma0803	<i>sma0803</i>	ABC 转运载体 ATP 结合蛋白	-3.1	-1.1	—	—
smb20786	<i>smb20786</i>	支链氨基酸吸收 ABC 转运蛋白异构酶	-1.4	—	—	—
sma1691	<i>trkH</i>	跨膜钾离子运输蛋白	-1.4	—	—	—
sma0709	<i>sma0709</i>	ABC 转运蛋白	-1.1	—	—	—
sma2311	<i>sma2311</i>	ABC 转运蛋白	-1.4	—	—	—
smb20504	<i>smb20504</i>	ABC 转运蛋白	-1.0	—	—	—
sma0799	<i>sma0799</i>	ABC 转运蛋白	1.3	—	—	—
smc00078	<i>livJ</i>	亮氨酸结合蛋白	1.0	—	—	—
smc02907	<i>smc02907</i>	氨基酸溢出蛋白	1.0	—	—	—
smc02423	<i>smc02423</i>	ABC 转运载体 ATP 结合蛋白	1.4	—	—	—
smc02831	<i>smc02831</i>	ABC 转运蛋白异构酶	1.3	—	—	—
smb20436	<i>smb20436</i>	硝酸运输蛋白	1.0	—	—	—

续表 2

基因序号	基因名称	基因产物	基因表达差异的倍数(log ₂ Ration) ^{a)}			
			SmY/pSAWB5	SmY/pRJ7556	SmY/pMAWB5	SmY/pEAWB5
smc01496	<i>smoE</i>	山梨糖醇结合周质蛋白	1.0	—	—	—
smc01497	<i>smoF</i>	山梨糖醇运输内膜蛋白	1.3	—	—	—
smc01498	<i>smoG</i>	山梨糖醇运输内膜蛋白	1.5	—	—	—
smc01499	<i>smoK</i>	ABC 转运载体 ATP 结合蛋白	1.6	—	—	—
smb20634	smb20634	糖吸收 ABC 转运载体周质蛋白前体	1.8	—	—	—
smb20364	smb20364	离子 ABC 运输蛋白异构酶	1.0	—	—	—
smb21595	smb21595	糖吸收 ABC 转运载体周质蛋白前体	1.1	—	—	—
smc03991	smc03991	ABC 转运蛋白	1.0	—	—	—
sma0300	sma0300	ABC 运输蛋白异构酶	1.5	—	—	—
smc02372	smc02372	跨膜运输蛋白	1.0	—	—	—
smc01829	smc01829	跨膜运输蛋白	1.1	—	—	—

a) —, 表达水平没有差异

生变化的基因中, 仅有 3 个基因(*fabII*, *smb20404* 和 *sma0959*)的表达水平增强. 丙酮酸脱氢酶复合体基因 *pdhAa* 与有氧呼吸有关的基因(*nuoA1*, *nuoD1*, *nuoE1*)以及参与氨基酸合成的 *LeuD*, *trpF*, *bkdAa* 和 *paaA* 的表达水平都下降. 24 个与运输相关的基因中有 7 个基因表达水平增强, 其余 17 个基因表达水平降低. 与细胞结构、适应性及与持家功能相关的 30 个基因表达水平都下降(表 2), 揭示了在营养饥饿状态下, *nifA* 突变的根瘤菌通过增强参与基础代谢的基因的表达来维持生存.

在 SmY/pRJ7556 中有 20 个基因的表达发生变化. 参与固氮的 *nifHDKE*, *fixABC*, *nifX* 和 *fdxB* 的表达水平增强了 5 倍. 参与中心代谢的 *napA* 和 *hyuB* 增强表达 2.3 倍(表 2). 同样, 在 SmY/pMAWB5 中只有 7 个基因的表达发生变化, 其中已知的 4 个基因(*nifH*, *nifK*, *fixA* 和 *fdxB*)都与共生相关, 它们的表达水平增强了近 3 倍(表 2). 在 SmY/pEAWB5 中也有 9 个基因的表达发生变化. 其中仅有 *nodI* 与共生相关, 并且它的表达水平增强. 另外与中心代谢相关的 2 个基因分别是 *trpE* 和 *paaC* (表 2).

在引入不同的 *nifA* 基因后, *S. meliloti nifA* 突变体根瘤细菌中表达水平差异最大的是与固氮相关的基因, 说明 *nifA* 基因在根瘤菌中的主要功能还是调节固氮过程. 但不同的 *nifA* 基因对 *S. meliloti nifA* 突变体的固氮基因表达水平的恢复能力存在差异.

2.3 异源 NifA 蛋白对 *S. meliloti* 的 *nifH* 启动子的激活作用

为了验证基因组微阵列实验的结果, 通过体内检测启动子活性的方法进一步分析了 *S. meliloti*, *B. japonicum*, *M. huakuii* 和 *E. cloacae* 共 4 种固氮菌

NifA 蛋白对 *Sm P_{nifH}-lacZ* (pHZ184)的激活水平. 把 4 种组成型表达 *nifA* 质粒 pSAWB5, pMAWB5, pRJ7556 和 pEAWB5 分别转移进入大肠杆菌 YMC12/pHZ184 和苜蓿中华根瘤菌 SmY/pHZ184 中, 测定 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的β-半乳糖苷酶活力. 结果表明, 在大肠杆菌中 *Bj*, *Mh* 和 *Ec nifA* 基因都可以激活 *Sm P_{nifH}-lacZ*, 并且激活水平与 *S. meliloti* 自身 *nifA* 基因对 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的激活作用没有明显的差异, 揭示这 4 种 *NifA* 蛋白都可以结合到 *Sm nifH* 的启动子上, 激活 *nifH* 基因的表达(图 2(a)). 但在共生时的 *S. meliloti* 中, *Bj nifA* 基因对 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的激活水平是 *SmnifA* 基因的 70%, *Mh NifA* 蛋白对 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的激活水平仅有 *Sm NifA* 蛋白的 50%, 而 *Ec NifA* 蛋白未能检测到β-半乳糖苷酶活力(图 2(b)).

S. meliloti, *B. japonicum*和*M. huakuii*都是共生固氮根瘤菌. 这类根瘤菌一般需要与宿主植物相互作用, 在宿主根部形成根瘤后, 才能启动固氮基因的表达从而进行固氮. 共生固氮根瘤菌在自生和共生两个不同的生存状态下基因表达的差异很大. 现在, 人们已经运用转录组学和蛋白组学技术筛选出很多在共生条件下增强表达的基因, 这些基因可能在共生固氮体系中起重要作用^[21~23]. 我们另外还报道了*Sm nifA*基因突变后引起 601 个基因的表达水平发生变化^[13]. 本研究以*Sm nifA*突变体作为遗传背景进行基因组微阵列实验, 研究不同来源的*NifA*蛋白对*SmnifA*突变体的互补, 发现有 238 个基因的表达水平可以被*Sm nifA*基因恢复, 为研究*nifA*基因的表达调控提供了新的线索.

在共生系统中, *S. meliloti*的*nifA*基因通过激活*nifHDKE*和*fixABCX*的表达正向调节固氮过程^[6]. 本

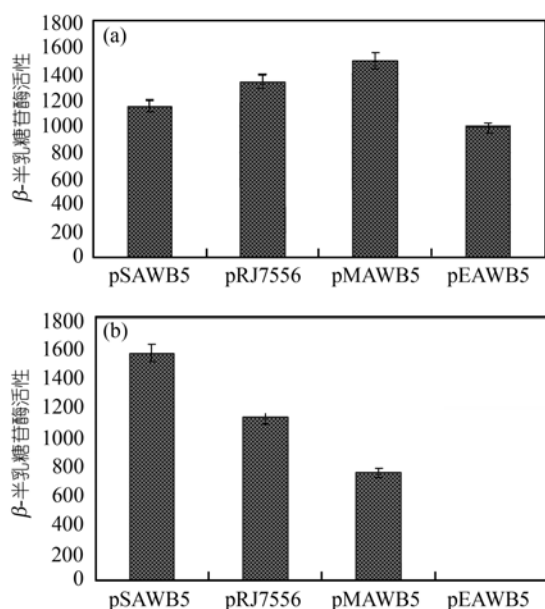


图2 *S. meliloti*, *B. japonicum*, *M. huakuii* 和 *E. cloacae* *nifA* 基因在大肠杆菌(a)和共生条件下的 *S. meliloti*(b)中对 *Sm nifH* 基因启动子的激活能力

研究结果显示, 异源的 *nifA* 基因具有激活 *S. meliloti* 的 *nifHDKE* 基因的能力, 因为在大肠杆菌中, *B. japonicum*, *M. huakuii* 和 *E. cloacae* 三种不同 *nifA* 基因对 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的激活水平与 *S. meliloti nifA* 基因相当. 但在共生状态下的 *S. meliloti* 中, 组成型表达的 *B. japonicum* 或 *M. huakuii nifA* 基因, 对 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的激活水平远低于 *S. meliloti nifA* 基因, 并且未能检测到 *E. cloacae nifA* 对 *Sm P_{nifH}-lacZ* 的激活作用. 我们推测, 在 *S. meliloti* 中存在特异性识别 NifA 蛋白的机制, 这个机制使 NifA 蛋白的调节功能具有专一性, 即在 *S. meliloti* 中, 只有 *Sm NifA* 蛋白才能完成对固氮的调节作用. 对这个识别机制进行深入地研究, 有助于进一步了解 *S. meliloti nifA* 基因的表达和调节机制.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展计划(批准号: 2001CB108901 和 2001CB108902)、国家自然科学基金(批准号: 30470940)及德国 Bundesministerium für Bildung und Forschung (批准号: 031U213D)和 Deutsche Forschungsgemeinschaft (批准号: BIZ 7)资助项目.

参 考 文 献

- Oke V, Long S R. Bacterial genes induced within the nodule during the rhizobium-legume symbiosis. *Mol Microbiol*, 1999, 32: 837—849[DOI]
- Perret X, Staehelin C, Broughton W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64: 180—201[DOI]
- Long S R. Genes and signals in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Plant Physiol*, 2001, 125: 69—72[DOI]
- Halverson L J, Stacey G. Signal exchange in plant-microbe interaction. *Microbiol Rev*, 1986, 50: 193—225
- Lodwig E M, Hosie A H, Bourdes A, et al. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*, 2003, 422: 722—726[DOI]
- Fischer H M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. *Microbiol Rev*, 1994, 58: 352—386
- Fischer H M, Ariel A M, Hennecke H. The pleiotropic nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum nifA* gene is involved in control of *nif* gene expression and formation of determinate symbiosis. *EMBO J*, 1986, 5: 1165—1173
- Hirsch A M, Smith C A. Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule development. *J Bacteriol*, 1987, 169: 1137—1146
- Nienaber A, Huber A, Göttfert M, et al. Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. *J Bacteriol*, 2000, 182: 1472—1480[DOI]
- Hertig C, Li R Y, Louarn A M, et al. *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixL* activates transcription of *R. meliloti nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, 171: 1736—1738
- Fischer H M, Hennecke H. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. *Mol Gen Genet*, 1987, 209: 621—626[DOI]
- 杨成涛, 俞冠翹, 沈善炯, 等. 苜蓿中华根瘤菌 *Sm NifA* 蛋白与阴沟肠杆菌 *Ec NifA* 蛋白功能差异的研究. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2003, 33(5): 398—404
- 田哲贤, 邹华松, 李健, 等. *nifA* 突变的苜蓿根瘤菌在根瘤中的转录组学分析. *科学通报*, 2006, 51(15): 1787—1793
- Meade H M, Long S R, Ruvkun G B, et al. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol*, 1982, 149: 114—122
- Beckman K, Chen Y M, Magasanik B. Physical and genetic characterization of the *glnA-glnG* region of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 3743—3747[DOI]
- Figurshi D H, Helinski D R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 1648—1652
- de Bruijn F J, Rossbach S, Schneider M, et al. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol*, 1989, 171: 1673—1682
- Pellock B J, Cheng H P, Walker G C. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol*, 2000, 182: 4310—4318[DOI]
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Harbor Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Miller J H. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992
- Rüberg S, Tian Z X, Krol E, et al. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: Genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol*, 2003, 106: 255—268 [DOI]
- Natera S H, Guerreiro N, Djordjevic M A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13: 995—1009
- Becker A, Berges H, Krol E, et al. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 292—303

(2006-07-04 收稿, 2006-09-01 接受)