

# 植物细菌天山根瘤菌调控基因 *mrtR* 在群体感应中的作用\*

赖欣 戴俊 郑会明 钟增涛<sup>†</sup> 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** 在许多种类的细菌中均发现了 *luxR/luxI* 类型的群体感应调控系统, 其中 *luxR* 是调节基因, 对 *luxI* 合成自体诱导物 (AI autoinducer) 起着正调控作用。通过建库筛选后, 测序比对发现天山根瘤菌中存在 *mrtR/mrtI* 系统。通过基因敲除和转录水平基因表达对 *mrtR* 进行研究, 发现 *mrtR* 严格调控着 *mrtI* 的表达, 同时 *mrtR* 的表达也受到 AI 影响, 这表明 *mrtR* 表达的调控是一种自调控, 同时根毛吸附实验显示该基因对根瘤菌与宿主间相互作用密切相关。

**关键词** 群体感应; 天山根瘤菌; *mrtR* 自调控

中图分类号 Q933 文献标识码 A

许多种类的细菌在高细胞密度下可以产生一类化学信号分子——自体诱导物 (AI autoinducer) 监控细胞群体浓度的变化, 这一现象被称为群体感应 (quorum sensing)<sup>[1]</sup>。当信号分子积累到一定浓度时可以与特异性受体蛋白结合, 调控细菌特定基因的表达, 包括细菌与真核生物的共生、细菌质粒的接合转移、抗生素的产生及生物膜的形成等<sup>[2-4]</sup>。目前对革兰氏阴性细菌的群体感应系统研究最为广泛, 酰基高丝氨酸内酯类化合物 (acyl-HSLs AHLs) 是在革兰氏阴性细菌群体感应调控中普遍存在的信号分子<sup>[5]</sup>。在革兰氏阴性细菌的群体感应调控系统中, 对费氏弧菌 (*Photobacterium fischeri*) 的 *luxR/luxI* 系统研究最为详细。 *luxI* 负责合成一种酰基高丝氨酸内酯类 (AHLs) 信号分子, AHLs 可以自由通过细胞膜并随着细胞密度增加而增加, 当积累到极限浓度 (约  $10 \text{ nmol L}^{-1}$ ) 时, 就能和细菌细胞质中的 LuxR 蛋白充分结合, 结合了自体诱导物的 LuxR 可以与 *luxICDABE* 基因启动子结合, 激活该基因的转录。该过程导致自体诱导物合成酶及荧光强度呈指数增加<sup>[6]</sup>。

根瘤菌可以侵入豆科植物根部形成根瘤, 固定空气中的分子氮, 与植物建立互惠的共生关系<sup>[5]</sup>, 而氮是植物生长所需的重要营养物质<sup>[7,8]</sup>。而对根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中的群体感

应系统中的 LuxR 同源蛋白 TraR 的研究表明, TraR 必须结合 AHLs 后才能正常折叠而不被蛋白酶水解, 并随即形成二聚体与 DNA 结合<sup>[9]</sup>, 说明了群体感应是一个复杂而完善的调控体系。而与 *luxR* 同源的基因对整个群体感应系统起着调控的作用。

本文以中慢生型天山根瘤菌 (*Mesorhizobium tianshanense*) 模式菌株 CCBAU 3306 为实验材料, 该菌株由陈文新院士于 1995 年自新疆干旱地区分离获得, 其原始宿主为刺果甘草 (*Glycyrrhiza pabliciflora*)<sup>[10]</sup>。 *M. tianshanense* 侵入甘草结瘤, 如上文提到的一样可以与植物建立互惠的共生关系进行固氮反应, 并能够合成 N-乙酰高丝氨酸内酯型 (N-AHL, N-acyl homoserine lactone) 化合物进行群体感应调控。通过对 AHL 合成基因的建库筛选, 获得了包括 AHL 合成基因的基因组片断, 经过序列分析发现了 *luxI* 同源的 AHL 合成基因 *mrtI* 和与 *luxR* 同源的调控基因 *mrtR*。本文在实验室前期对 *mrtI* 基因转录调控研究的基础上, 通过基因敲除技术和回复突变的方法, 确切研究了 *mrtR* 在群体感应中的调控作用, 并通过植物试验确定了 *mrtR* 对细菌侵染植物有明显的影 响。这为进一步了解 *M. tianshanense* 群体感应的调控机理和群体感应与细菌侵染植物之间的联系奠定了基础。

\* 国家杰出青年基金项目 (30325004)、国家自然科学基金项目 (30570011) 与 973 项目 (001CB1089) 联合资助

<sup>†</sup> 通讯作者, TeIFax: 025-84396645 E-mail: zzhong@njau.edu.cn

作者简介: 赖欣 (1981~), 男, 硕士研究生。E-mail: 2004116069@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-12-11; 收到修改稿日期: 2007-04-18

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

1.1.1 菌株和质粒 试验所用菌株和质粒及其特性见表 1。

表 1 供试菌株和质粒及其特性

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株和质粒 Strains and Plasmids	特性 Characterization
菌株 Strains	
天山根瘤菌	
<i>M. tianshanense</i>	
CCBAU 3306	野生型 <sup>[10]</sup>
HM Z0	链霉素突变株 <sup>[11]</sup>
HM Z2	缺失 <i>mrtI</i> 的 HM Z0 <sup>[11]</sup>
XL5	缺失 <i>mrtR</i> 携带 <i>mrtR-lacZ</i> 的 HM Z0
XL6	缺失 <i>mrtR</i> 携带 <i>mrtR-lacZ</i> 的 HM Z2
XL7	转入 pXL104 的 XL5
XL8	转入 pXL104 的 XL6
根癌农杆菌	
<i>A. tumefaciens</i>	
JZA 1	自体诱导物的检测菌株 <sup>[12]</sup>
质粒 Plasmids	
pVK112	包含 R6K 复制子的, <i>lacZ</i> 转录融合载体 <sup>[13]</sup>
pXL103	包含 <i>mrtR</i> 中间片段的 pVK112
pXL104	表达 <i>mrtR</i> 的 pBBR 质粒

1.1.2 培养基和培养条件 天山根瘤菌及相关突变株采用 TY 培养基在 28℃ 下培养, JZA 1 用 AT 培养基在 28℃ 下培养。 *E. coli* 菌株采用 LB 培养基, 在 37℃ 下培养。 抗生素所用终浓度: JZA 1 所用四环素 (Tc) 为 2  $\mu\text{g m}^{-1}$ ; 壮观霉素 (Sp) 为 100  $\mu\text{g m}^{-1}$ ; 庆大霉素 (Gm) 为 100  $\mu\text{g m}^{-1}$ 。 *E. coli* 所用卡那霉素 (Km) 为 100  $\mu\text{g m}^{-1}$ 。

1.1.3 试剂 Taq 酶, 各种限制性内切酶购自 Takara 公司, 引物合成与测序由上海博亚生物技术公司完成。 LB, TY, AT 培养基使用 Oxid 公司试剂配制。 其他试剂为国产分析纯或进口分装。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 根据本实验室所得 *mrtR-mrtI* 序列 (GenBank accession no. DQ123807) 设计

*internalmrtR* 用于构建 pXL103, 上游引物为 5' GT-GAATTCTTGAGGGGATTGGGGCAG 3', 5' 引入 EcoRI 限制酶切位点, 下游引物 5' GCTCTAGATCGCGCGT-GGTGTGCTCC 3', 5' 引入 XbaI 限制酶切位点。 PCR 体系及扩增条件为: 10  $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu\text{l}$  EcoRI 和 XbaI 引物各 2.5  $\mu\text{l}$  每种 2.5 mmol L<sup>-1</sup> dNTP 5  $\mu\text{l}$  Taq 1  $\mu\text{l}$  pHM Z9B1 1  $\mu\text{l}$  加去离子水至 50  $\mu\text{l}$  混匀后在如下条件下进行扩增: 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。 为了便于验证和进一步克隆, PCR 产物先与 pBSK 连接, 测序验证后, 酶切后与 pVK112 连接, 转入 BW 20676。

1.2.2 菌株的构建 将携带 pXL103 质粒的 BW 20676 与 HM ZQ HM Z2 结合, 得到相应的 XL5, XL6 菌株。

1.2.3  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性的检验 按照 Miller<sup>[14]</sup> 的方法进行检验。

1.2.4 AHL 的检验 在含 10% 体积比根瘤菌上清的 AT 培养基<sup>[2]</sup> 中接入约 10<sup>7</sup> m<sup>-1</sup> 的显色菌 JZA 1<sup>[11]</sup>, 培养 12 h 后, 检验  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。

1.2.5 C18 反相薄层层析 参考高轶静等<sup>[15]</sup> 的方法使用 Whatman 的反向层析膜进行。

1.2.6 回复突变 将 pXL104 通过结合, 转入 XL5, XL6 菌株, 得到有外源表达 *mrtR* 的菌株 XL7, XL8。

1.2.7 根毛吸附试验 甘草种子表面消毒处理后, 培育至根长约 1 cm 左右, 放入含 200  $\mu\text{l}$  菌液 (OD<sub>600</sub> = 1.5) 的 20 ml AT 缓冲液中 (pH 7.3), 在 28℃ 培养 4 h, 然后将根用无菌水轻微振荡清洗, 除去未完全附着在根部的细菌。 接着将种子根部转移到有玻璃珠的离心管中, 加入 2 ml 无菌水进行振荡, 然后将菌体悬浮液通过涂布平板进行计数。

## 2 结 果

### 2.1 *mrtR*I 区域

图 1 为 *mrtR*I 的序列示意图, 包括 *mrtR* 和 *mrtI* 其中用于构建 pXL103 的部分用箭头表示出来。 构建 *mrtR-lacZ* 融合表达菌株的质粒 pXL103 时使用的 *mrtR* 片段是不完整的中间片段, 目的是构建阅读框内敲除 *mrtR* 的菌株, 从而研究 *mrtR* 基因在群体感应中的调控作用。

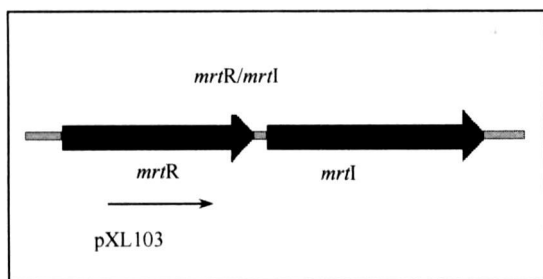


图 1 *mrtR* 和 *mrtI* 区域示意  
Fig 1 Loci of *mrtR* and *mrtI*

## 2.2 *mrtR* 在产生 AHL 中的影响

A I 的活性和 TLC 板是按照前文所述的方法测定  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性得到的。如图 2 所示, 通过本研究构建的 *mrtR* 阅读框内缺失的菌株 (XL5), 发现其丧失了合成 A I 的能力, 而将含有外源的 *mrtR* 表达载体转入该菌株后, A I 的合成水平基本恢复 (XL7)。说明 *mrtI* 的表达受 *mrtR* 的严格调控的, 而且 *mrtR* 对 *mrtI* 的调控与其他 *luxR* / *luxI* 系统一样是正调控作用。这表明 *mrtR* 在群体感应中发挥着对合成 A I 进行调控的关键作用。

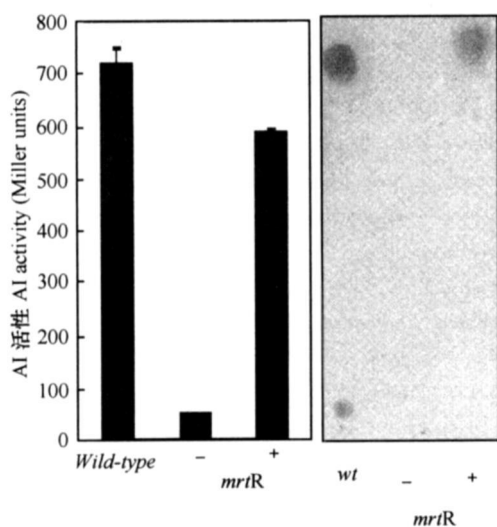


图 2 *mrtR* 对菌株上清中 A I 活性的影响 (误差线如图示)  
Fig. 2 AI activity of wild-type *mrtR*<sup>-</sup> and *mrtR*<sup>+</sup> containing pXL104  
(The error bar is shown)

## 2.3 *mrtR-lacZ* $\Delta$ *mrtR* 菌株的 $\beta$ -半乳糖苷酶表达水平

图 3A 显示了天山根瘤菌基因组 *mrtR* 在 *mrtI* 完整的情况下的表达情况。它们分别在 TY 中 28°C 培养 24 h 后测得。由于 2 种菌株自身均缺失 *mrtR*, 无法表达 *mrtR*。通过比较图 3A 可以发现, 当 *mrtR* 缺失时, *mrtR* 自身的表达始终处于较低水平 (XL5);

当有外源的 *mrtR* 表达时 (XL7), *mrtR-lacZ* 的 *lacZ* 水平有了明显提高。即只有在 *mrtR* 和 *mrtI* 均表达的情况下, *mrtR* 的表达水平才会提高。图 3B 中显示了天山根瘤菌基因组 *mrtR* 在 *mrtI* 缺失的情况下的表达情况。结果表明在 *mrtI* 缺失的情况下基因组 *mrtR* 的表达始终处在极低水平。上述结果说明 *mrtR* 的表达受着 *mrtR* 和 *mrtI* 的调控, 而 *mrtR* 又对 *mrtI* 的表达进行着严格的调控。结合 M rR 活性需要 A I 存在的结果, 证明在天山根瘤菌群体感应系统中 *mrtR* 的调控是采用自调控的方式进行的。

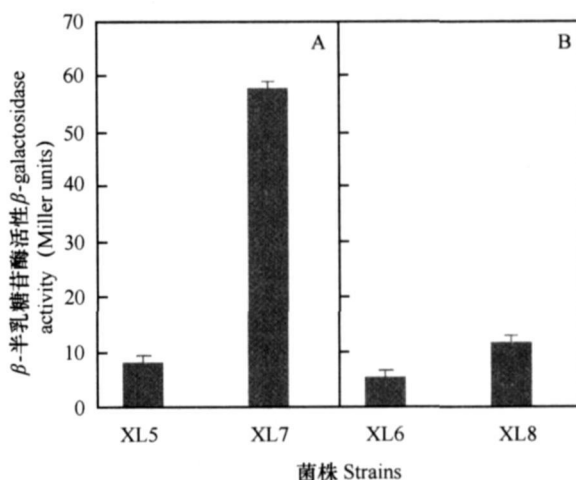


图 3 缺失 *mrtR* 和回复突变的菌株中的 *lacZ* 表达水平  
(误差线如图示)  
Fig. 3 *mrtR-lacZ* expression in XL5 XL6 XL7 and XL8  
(The error bar is shown)

上述结果 (图 2 图 3) 表明 *mrtR* 在调节 *mrtI* 合成的同时, 也受着 A I 水平调控自身的表达, 这表明 *mrtR* 和 *mrtI* 存在着一种反馈调节作用。在低细胞密度的情况下, 两个基因的表达均处于较低水平; 当细胞密度达到一定程度, 有足够浓度的 A I 与 M rR 结合, 使之具有活性正调控 *mrtI* 和 *mrtR* 的表达, 从而启动该调控系统的功能。这为天山菌株群体感应现象提供了一种可能的机理解释。

## 2.4 *mrtR* 对根毛吸附的影响

为了进一步研究该调控基因在菌植互做中的作用, 对该阅读框内缺失 *mrtR* 菌株进行了根毛吸附试验。图 4 的结果显示了 *mrtR* 在根毛吸附过程中的影响。缺失 *mrtR* 的菌株对根毛的吸附能力明显下降, 而回复突变菌株在吸附能力方面有明显恢复, 这表明 *mrtR* 对菌株的生理功能有显著影响。这一结果与缺失 *mrtI* 的植物试验结果相似, 进一步表明 *mrtR* 在群体感应中起到关键的调控作用, 也说明

由于 *mrtR* 是自调控并严格调控 *mrtI* 的表达, 无论缺失 *mrtR* 或 *mrtI* 最终均会导致群体感应系统停止运作, 引起菌株的生理功能改变。

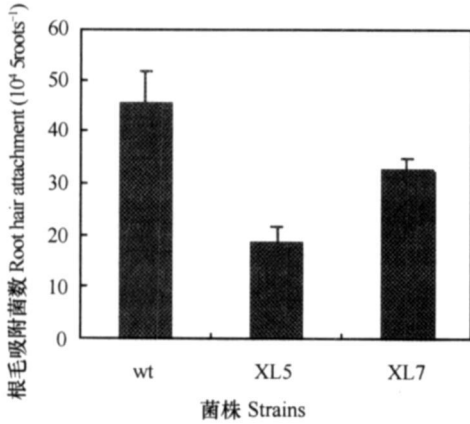


图 4 *mrtR* 基因对根毛吸附的影响 (误差线如图示)

Fig 4 Effect of *mrtR* on root hair attachment (The error bar is shown)

### 3 讨 论

使用基因敲除技术, 发现天山根瘤菌在 *mrtR* 缺失的情况下对 *mrtR* 的表达和它对群体感应系统的影响进行研究, 发现不只是 AI 合成需要 *mrtR*, 同时 *mrtR* 的表达也受 *mrtI* 的调控。这些结果证明了 *mrtR* 在群体感应合成 AI 中起着关键的调控作用, 在低细胞浓度的情况下, 2 个基因的表达均处于较低水平, 而当细胞浓度逐渐增加, AI 的浓度随之不断积累, 直至达到一定的浓度, 即极限浓度。这时 AHLs 与 M rR 蛋白充分结合, 使其正确折叠从而具有生物活性, 该活性蛋白可以正调控 *mrtI* 和 *mrtR* 的表达, 从而启动了 *mrtI/mrtR* 这一群体感应调控系统, 产生级联放大效应。同时在 *M. tianshanense* 中 *mrtR* 的表达采用的是一种自主调控的方式进行的, 只有当 AI 的浓度积累到一定水平, 激活调控蛋白 M rR 后, 由 M rR 对 AI 的合成和 *mrtR* 的表达进行正调控, 促进 AI 和 *mrtR* 的合成, 同时也可以对其他 *mrt* 启动子进行调控, 进而改变细胞的生理功能。总而言之, 在 *mrtR/mrtI* 群体感应系统中, AI 的浓度决定了整个系统的启动, *mrtR* 在该系统中起到了关键的调控作用, 而 *mrtR* 的表达是一种自调控的形式进行的。进一步的试验表明, *mrtR* 在群体感应中的调控作用在根瘤菌对宿主的侵染过程中也起到重要作用。

目前对根瘤菌群体感应的研究主要集中在对

*M. huakuii* 93 中自体诱导物信号分子的检测<sup>[12, 17]</sup>, 以及该菌群体感应系统对生物膜形成的影响方面<sup>[16]</sup>。虽然与 *luxR* 同源的 *mrtR* 在群体感应中有着重要的作用, 但对其的研究并不常见。本文首次对 *M. tianshanense* 的 *mrtR* 对群体感应中作用和自身表达的调控进行了研究, 为全面了解 *M. tianshanense* 群体感应的调控机理开辟了道路。同时, 由于根瘤菌本身的特殊性, 进一步地研究 *M. tianshanense* 本身细胞间的联系, 及其与其他细菌包括植物宿主之间的作用, 无论在环境保护还是经济发展角度均有着理论和潜在的应用意义。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Bassler B L. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(6): 582~587
- [ 2 ] Fuqua W C, Winans S C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, 1994, 176(10): 2796~2806
- [ 3 ] Miller M B, Bassler B L. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 165~199
- [ 4 ] Wang H, Zhong Z T, Zhu J. Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*. *Arch Microbiol*, 2004, 182(6): 520~525
- [ 5 ] Parsek M R, Greenberg E P. Acylhomoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *PNAS*, 2000, 97(16): 8789~8793
- [ 6 ] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, 176(2): 269~275
- [ 7 ] Loh J, Pierson E A, Pierson L S, et al. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(4): 285~290
- [ 8 ] Duan Y H, Zhang Y L, Sheng Q R, et al. Nitrate effect on rice growth and nitrogen absorption and assimilation at different growth stages. *Pedosphere*, 2006, 16(6): 707~717
- [ 9 ] Zhu J, Winans S C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *PNAS*, 2001, 98(4): 1507~1512
- [ 10 ] Chen W X, Wang E T, Wang S Y, et al. 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 ] Zheng H M, Zhong Z T, Lai X, et al. A LuxR/LuxI type quorum-sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tians-*

- tianshanense* controls symbiotic nodulation. *J. Bacteriol.*, 2006, 188(5): 1943~1949
- [12] Zhu J, Chai Y R, Zhong Z T, *et al*. 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(11): 6949~6953
- [13] Kabgenaki V S, Winans S C. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene*, 1997, 188(1): 69~75
- [14] Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972
- [15] 高轶静, 钟增涛, 郑会明, 等. 华葵根瘤菌中自体诱导物的初步研究. *微生物学报*, 2005, 45(1): 19~22. Gao Y J, Zhong Z T, Zheng H M, *et al*. Study on AHL-like quorum signals in *Mesorhizobium huakuii* (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(1): 19~22
- [16] 杜寒春, 郑会明, 周晶, 等. 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. Du H C, Zheng H M, Zhou J *et al*. Effect of nitrogen transfer on growth of wheat in milk vetch-wheat mixed cropping after inoculation of rhizobium (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(6): 1043~1046
- [17] 钟增涛, 周晶, 李路, 等. 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. Zhong Z T, Zhou J, Li L, *et al*. Detection of autoinducer in mesorhizobium and red soil (In Chinese). *Soils*, 2005, 37(1): 62~64

## ROLE OF REGULATORY GENE *mrtR* OF PLANT BACTERIUM *MESORHIZOBIUM TIANSHANENSE* IN QUORUM SENSING

Lai Xin, Dai Jun, Zheng Huiming, Zhong Zengtao<sup>†</sup>, Zhu Jun

(Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** The ability of rhizobia to symbiotically fix nitrogen from the atmosphere when forming nodules on their host plant roots requires signal transduction pathways. LuxR/LuxI family proteins are a unique quorum-sensing system, found in many bacteria. LuxR is a regulatory protein which regulates LuxI type proteins in synthesizing autoinducer (AI). In this study, sequence analysis was conducted finding a LuxI type synthase gene, *mrtI*, and a regulatory gene *mrtR* present in *M. tianshanense*, which are homologous to the LuxR/LuxI type of protein. Using gene knock-out, *mrtR* was found regulating the expression of *mrtI*. Furthermore, using *lacZ* transcriptional fusion, AHL molecule demonstrating a key role in *mrtR* expression, which proves that *mrtR* is auto-regulated. The root hair adherence experiment showed that *mrtR* affected plant-bacteria interaction. These data show that it is necessary to have *mrtR* bonded with AHLs for *mrtI* expression and the gene plays a key role in regulating the quorum sensing system of *M. tianshanense*.

**Key words** Quorum-sensing, *Mesorhizobium tianshanense*, *mrtR*, Auto-regulation