

nifA 突变的首蓿根瘤菌在根瘤中的转录组学分析

田哲贤* 邹华松* 李健 张远涛 刘影 俞冠翘 朱家璧

Silvia Rüberg Anke Becker 王忆平†

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程暨植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871; 中国科学院上海生命科学院上海植物生理及生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032; Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Postfach 100131, 33501 Bielefeld, Germany. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: wangyp@pku.edu.cn)

摘要 用全基因组微阵列比较了根瘤中首蓿根瘤菌 1021 的 *nifA* 突变菌和野生菌的基因表达谱. 分析结果表明, *nifA* 的缺失引起 601 个基因的表达发生变化. 这些基因分别属于生物大分子的合成代谢、三羧酸循环及呼吸代谢以及结瘤固氮过程等多个功能组, 预示着根瘤中细菌的生长状态发生了显著的变化. 在根瘤中, *fixK* 以及受其激活的基因在 *nifA* 突变菌中的表达量显著高于野生菌. 定量实时 PCR 分析表明, 根瘤中 *fixLJ* 的转录水平在 *nifA* 突变菌中显著高于野生菌. 通过统计学方法从 13 个表达发生显著变化的基因的上游调控序列中找到推测的 NifA 结合位点.

关键词 转录组 NifA FixJ 根瘤细菌

中华首蓿根瘤菌是革兰氏阴性土壤细菌, 可以在豆科植物的根瘤中与豆科植物共生固氮 [1]. 建立有效的共生体系需要细菌和宿主植物细胞相互特异识别以及各自分化. 有很多根瘤菌的基因与此过程有关, 并有复杂的调控机制 [2]. 根瘤菌在根瘤中分化成能固氮的类菌体. 在类菌体中, 固氮过程相关基因 (*nif*) 和微氧呼吸相关基因 (*fix*) 得到表达 [3]. 微氧信号是 *nif* 和 *fix* 基因表达的重要调控因子 [4]. *fixL* 和 *fixJ* 基因编码一个二组分调控系统, 氧信号感应蛋白 FixL 使应答蛋白 FixJ 磷酸化. 磷酸化的 FixJ 激活 *fixK* 和 *nifA* 的转录 [5-7]. FixK 激活 *fixNOQP* 的表达, 抑制 *nifA* 的表达 [8]. NifA 是 *fixABCX*, *nifN* 和 *nifB* 基因以及编码固氮酶的 *nifHDK* 基因表达所必需的转录因子. 此外, 在首蓿根瘤菌中, NifA 还对一些没有直接参与固氮过程的基因进行表达调控, 如与竞争结瘤、结瘤素合成、根瘤发育及类菌体的抗逆性有关的基因 [9]. NifA 结合到上游增强子类似的序列上, 通过 DNA-环 (DNA-looping) 激活下游 $E\sigma^{54}$ -依赖型启动子的转录 [10]. NifA 形成二聚体后具有转录激活功能, 其在启动子上的结合序列具有回文结构 [11].

有研究表明, *nif* 和 *fix* 基因的突变对类菌体的分化过程有影响 [12-14]. *nifA* 突变菌株诱导产生不能固氮的 Fix⁻ 根瘤, 与野生菌诱导产生的根瘤在结构上有很大差别. 由 *nifA* 突变菌株诱导产生的根瘤中类菌体少且小. 由 *fixJ* 突变菌株诱导产生的根瘤也有类似的特点. 由于首蓿根瘤菌 1021 全基因组序列的解析 [15-18],

研究人员可以利用 DNA 微阵列来高通量地研究基因表达调控, 如高渗 [19]、微氧及共生 [20] 以及磷缺乏条件下的基因表达谱分析 [21]. 含有首蓿根瘤菌 1021 全基因组以及三叶草首蓿 10000 个 EST 的双基因组芯片被用来比较 *fixJ* 突变菌株及野生菌诱导产生的根瘤 [22].

尽管对共生固氮中基因表达调控的研究有较大进展, 但对其调控网络及其对根瘤中细菌的生理过程的影响并不十分清楚. 本研究分析了 *NifA* 突变菌株引起的根瘤中首蓿根瘤菌的基因表达谱, 为与 *NifA* 有关的基因表达调控网络提供一些线索, 同时也为 *NifA* 对类菌体代谢及发育的调控作用提供新信息.

1 材料和方法

() 菌株. *nifA* 突变的首蓿根瘤菌 SmY [23] 来源于野生菌 1021 [24]. 为了突变 *nifA* 基因, 将带有卡那霉素抗性基因的 DNA 片段插入野生菌 Rm1021 的 *nifA* 编码序列中. 插入位点是 *nifA* 编码序列中惟一的 *Sal* 酶切位点, 在起始密码子下游 942 个碱基对处, 即在本研究中使用的 *nifA* 寡聚核苷酸杂交探针 (70 个核苷酸, 5'-cggcgagattccccggcgttccaagcaaaactgctacgcgta-atacaggaaggtgaatttgagcgagtc-3') 结合位点下游 24 个碱基对处. 通过同源重组对野生首蓿根瘤菌 1021 基因组上的 *nifA* 基因进行突变.

() 植物的培养. 用 0.1% HgCl₂ 处理过的首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,共种植3次,每次间隔1周.每次接种野生菌1021的植株不少于50棵,接种突变菌SmY的植株不少于150棵.在无氮条件下培养4周后收获根瘤,并立即冻在液氮中,于-80保存备用.

() RNA的纯化及cDNA的标记. 用RNeasy Mini Kit (Qiagen, 德国)分离纯化根瘤总RNA. 由于Sm6kOligo微阵列与植物根的RNA的杂交很弱(结果未显示),故直接用根瘤的总RNA. 在液氮中,研磨0.3 g冻存的根瘤,用4.5 mL RLT缓冲液进一步裂解根瘤菌,把裂解液分装到6个1.5 mL离心管中. 用酚-氯仿反复抽提,最后用异丙醇沉淀RNA. 污染的DNA用DNase 处理,并通过RNeasy Mini Kit (clean-up步骤)纯化. 将用同种根瘤菌接种的同一期植物中得到的RNA合并在一起. 根据以前的报道,取15~30 μ g总RNA合成荧光标记的cDNA探针^[19].

() 微阵列杂交和图像的获得. Sm6kOligo 微阵列包含所有苜蓿根瘤菌基因的特异探针,即6212个70 mer寡聚核苷酸和3个PCR片段(有关微阵列的设计及相关参数可以参考<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>,数据库代码是A-MEXP-230). 杂交按照文献^[19]的方法进行. 从3个不同时期根瘤样品中获得的cDNA分别于3个微阵列进行杂交. 微阵列用GenePix 4000B微阵列扫描仪(Axon Instruments, 美国)进行10 μ m像素的扫描.

() 数据分析. 用GenePix Pro 4.0 (Axon, 美国)软件获取微阵列杂交图像,并进行杂交点信号定量. 用TIGR ExpressConverter 1.4 软件^[25]把GenePix数据(gpr格式)转换成TIGR MultiExperiment Viewer文件格式(mev格式). 在这个转换过程中,每个杂交点的信号强度都减去了背景强度. 用TIGR MIDAS 2.17 软件^[25]进行最低适配度(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 \log_2 Ratio用TIGR MEV 2.2 软件^[25]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. 3个或3个以上的数据缺失的基因不再进一步分析. 利用Excel-Addin SAM 1.21 软件^[26],筛选出表达显著上调或下调的基因. 分析过程中回应格式(response format)设为'one class', delta值设为1.2. 当 \log_2 Ratio不小于

1.00 或不大于-1.00 时,基因的表达有显著的差异.

() 根瘤细菌中P*fixN1*::*lacZ*和P*nifA*::*lacZ*的 β -半乳糖苷酶活性测定. 根据苜蓿根瘤菌的基因组序列,设计了*fixN1* 特异引物(5'-cccaagcttcattgctt-gtatttc-3'和 5'-cgggatccatctcgactgtgtgttc-3')和*nifA* 特异引物(5'-cccaagcttaaactgctcgcg-3'和 5'-gaagatcttcaag-acgagtggggcc-3'). 将PCR产物克隆到广宿主质粒pGD926^[27]的*Hind* /*Bam*H 酶切位点之间. 通过三亲杂交,把这些质粒及对照空载体导入到*nifA*缺陷的SmY及野生菌Rm1021 中. 植物培养、根瘤菌接种、根瘤收获等条件与微阵列实验中的条件一致. 根瘤细菌的 β -半乳糖苷酶的活性测定按照以前描述的方法进行^[28].

() 定量实时PCR. 独立于微阵列实验,从不同批次的根瘤中分离纯化RNA,并用无RNase的DNase 酶去除基因组DNA的污染. 定量实时PCR按文献^[20]的方法进行. 所用的PCR引物为:*fixK1*, 5'-tgcaggagcgttcgcgggagctt-3'和 5'-gagcgcagcgttcggc-cttcat-3'; *fixN1*, 5'-cctctgctaacaatcgtctgggtt-3'和 5'-gaccggcggttcacctgtttcg-3'; *fixL*, 5'-ggcacaatcgtctcctcaac-3'和 5'-gccatttcgccatctcat-3'; *fixJ*, 5'-ggttctcgtgacggacc-tga-3'和 5'-gagcacctggcgttctctct-3'; 以及对照16S rDNA, 5'-ttgacaatgggcaagcctgat-3'和 5'-agccgccttcgccactggtt-cttct-3'. 利用Q-gene软件^[29]计算归一化之后的基因表达强度比. 16S rDNA的CT平均值作为归一化的参比.

() NifA结合位点分析. 根据Berg和von Hippel的方法^[30,31], 本室编写了一个计算机程序LZ, 用来进行基于矩阵(matrix)的DNA上蛋白结合位点的预测. 在NCBI数据库中的65个含有NifA结合位点的序列基础上,得出了22碱基对的NifA保守序列. 考虑到数据库中的NifA结合位点的差异能值(discrimination energy, DE)都低于12,推测的NifA结合位点的差异能值不应高于12.

2 结果

2.1 根瘤中*nifA* 突变菌和野生菌基因表达谱的差异

为了比较根瘤中*nifA* 突变菌和野生菌的基因表达谱,从根瘤中分离纯化RNA,进行了微阵列杂交实验. 用每个基因的表达差异倍数的对数值(*M*值)对该基因的杂交信号强度的对数值(*A*值)进行作图(图1(a)),从这个分布图中可知,*nifA* 的突变导致了全基因组表达谱的巨大改变,共有601个基因表现出有显

著的表达差异. 在 *nifA* 突变菌中, 310 个基因的转录水平高于野生菌, 291 个基因的转录水平低于野生菌. 在 *nifA* 突变菌中, 染色体、pSymA 和 pSymB 大质粒中转录水平下降的基因数的比例大致与这 3 个复制单元上的基因数目比例相符, 转录水平上调的基因主要分布在染色体上(图 1(b)). 在表 1 中列出了表达量差异超过 5 倍的基因.

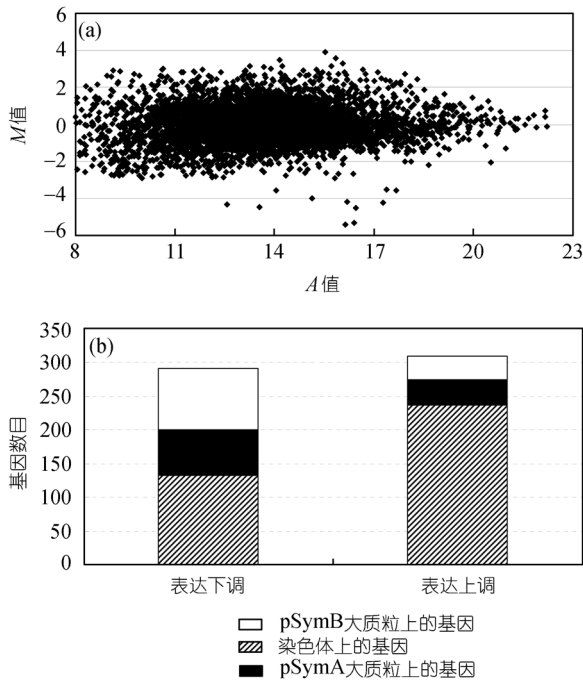


图 1 *nifA* 突变的根瘤细菌和野生的根瘤细菌的全基因组表达谱比较

(a) 每个基因的表达差异倍数的对数值($\log_2(I_{nifA}/I_w)$, M 值)对该基因杂交信号强度的对数值($\log_2(I_{nifA}/I_w)^{0.5}$, A 值)进行作图; (b) 上调和下调的基因在 3 个复制单元中的相对分布

表 1 在 *nifA* 突变的根瘤细菌与野生根瘤细菌的基因表达谱比较中有 5 倍以上差异的基因

基因序号	基因产物	\log_2 -Ratio (<i>nifA</i> vs 野生型)
<i>sma0011</i>	SelA 硒代半胱氨酸合成酶	2.76
<i>sma0278</i>	假拟蛋白	-2.43
<i>sma0763</i>	假拟蛋白	2.73
<i>sma0769</i>	FixP2 细胞色素 c 氧化酶	2.41
<i>sma0771</i>	假拟蛋白	2.33
<i>sma0803</i>	推测的 ABC 转运 ATP 结合蛋白	-3.56
<i>sma0806</i>	可能的类 <i>SyrB</i> 调控子	-2.66
<i>sma0816</i>	FixX 类铁氧还蛋白蛋白	-2.90
<i>sma0817</i>	FixC 氧化还原酶	-4.21

续表 1

基因序号	基因产物	\log_2 -Ratio (<i>nifA</i> vs 野生型)
<i>sma0819</i>	FixB 电子传递黄素蛋白 α 链	-5.43
<i>sma0822</i>	FixA 电子传递黄素蛋白 β 链	-5.33
<i>sma0825</i>	NifH 固氮酶 Fe 蛋白	-4.25
<i>sma0827</i>	NifD 固氮酶 Fe-Mo α 链	-3.54
<i>sma0829</i>	NifK 固氮酶 Fe-Mo β 链	-3.58
<i>sma0831</i>	NifX 固氮蛋白	-4.01
<i>sma0833</i>	保守的假拟蛋白	-4.55
<i>sma0872</i>	假拟蛋白 ORF 110	-4.36
<i>sma0873</i>	NifN 固氮酶 Fe-Mo 辅因子生物合成蛋白	-4.49
<i>sma1211</i>	FixG 硫铁膜蛋白	2.56
<i>sma1220</i>	FixN1 血红素 b / 铜细胞色素 c 氧化酶亚基	2.38
<i>smb20245</i>	推测的 NDP-葡萄糖脱水酶差向异构酶蛋白	-2.44
<i>smb20408</i>	保守的假拟蛋白	-2.70
<i>smb20449</i>	推测的甲基转移酶蛋白	-2.60
<i>smb20766</i>	推测的 ISRM22 转座酶蛋白	2.69
<i>smb20847</i>	推测的 <i>lysR</i> 家族转录调节子	-2.78
<i>smb21108</i>	保守的假拟蛋白	-2.46
<i>smb21685</i>	假拟蛋白	2.58
<i>smc00320</i>	RbfA 核糖体结合因子 A, rRNA 加工蛋白	3.09
<i>smc00529</i>	NifS 磷酸吡哆醛依赖的转氨酶蛋白	2.68
<i>smc00530</i>	保守的假拟蛋白	3.59
<i>smc00532</i>	保守的假拟蛋白	2.51
<i>smc00740</i>	保守的假拟蛋白	2.37
<i>smc01004</i>	推测的 HisI 磷酸核糖-AMP 环化水解酶蛋白	2.68
<i>smc01005</i>	FoIE 可能 GTP 环化水解酶 I 蛋白	3.01
<i>smc01030</i>	PdhAa 推测的脱氢酶 $\alpha 2$ 亚基蛋白	3.28
<i>smc01032</i>	PdhB 二氢硫辛酰胺 S 乙基转移酶蛋白	2.69
<i>smc01034</i>	假拟蛋白	3.16
<i>smc01142</i>	可能的 HSP	2.39
<i>smc01173</i>	假拟蛋白	2.45
<i>smc01260</i>	可能转录调节子蛋白	2.37
<i>smc01285</i>	RpoA 可能 DNA 引导的 RNA 聚合酶 α 链蛋白	2.34
<i>smc01303</i>	RpsC 可能 30S 核糖体蛋白 S3	2.76
<i>smc01305</i>	RpsS 可能 30S 核糖体蛋白 S19	2.42
<i>smc01308</i>	RplD 可能 50S 核糖体蛋白 L4	2.56
<i>smc01313</i>	RpsG 可能 30S 核糖体蛋白 S7	2.84
<i>smc01451</i>	保守的假拟蛋白	3.17
<i>smc01453</i>	TRm22 可能的转座酶蛋白	2.94
<i>smc01497</i>	SmoF 可能的转运山梨醇/甘露醇的内膜跨膜蛋白	2.34
<i>smc01499</i>	SmoK 可能 ATP 结合的转运蛋白	2.90
<i>smc01856</i>	推测的肌氨酸氧化酶蛋白	2.35
<i>smc01864</i>	MurD UDP-N-乙酰胞壁酰丙氨酸-D-谷氨酸连接酶	2.69
<i>smc01917</i>	NuoE1 NADH 脱氢酶 链 E 蛋白	2.43
<i>smc01918</i>	NuoF1 NADH 脱氢酶 链 F 蛋白	2.65
<i>smc02109</i>	ClpA 可能的 ATP 依赖的 Clp 蛋白酶 ATP-结合亚	2.58
<i>smc02110</i>	保守的假拟蛋白	2.62
<i>smc02435</i>	HemK1 推测的甲基转移酶蛋白	2.72
<i>smc02654</i>	AcpS 可能的 holo-acyl-载体蛋白合成酶	2.33
<i>smc02655</i>	推测的跨膜蛋白	3.93
<i>smc02756</i>	推测传感器组氨酸激酶蛋白	2.66
<i>smc02913</i>	假拟蛋白	2.81
<i>smc02983</i>	推测的鸟氨酸, DAP 或精氨酸脱羧酶蛋白	3.16
<i>smc03249</i>	假拟蛋白	2.97
<i>smc03751</i>	假拟蛋白	3.47
<i>smc03817</i>	推测的蔗糖激酶蛋白	2.37

nifA 突变的根瘤细菌中, 与 DNA 复制(*recR*, *ihfB* 和 *gyrB*)及 RNA 转录(*rpoA*, *rpoB*, *nusA*, *infB*, *rpoN*, *rpoH1* 及 *nusG*)有关的基因的表达量高于野生根瘤细菌. 蛋白翻译过程在野生的根瘤细菌中明显受抑制, 因为 25 个核糖体蛋白的基因及另外 4 个与蛋白和多肽合成修饰有关基因(*tufA*, *tufB*, *infC* 和 *fusA1*)的表达量在 *nifA* 突变的根瘤细菌中较高. 另一方面, 与蛋白或多肽的降解有关的基因(*clpA*, *ctpA* 和 *hslV*)在 *nifA* 突变的根瘤细菌中表达量比野生的根瘤细菌高. 与 TCA 循环有关的 4 个基因(*acnA*, *sucB*, *sucD* 和 *mdh*)、丙酮酸脱氢酶复合体基因(*pdhAa*, *pdhB* 和 *lpdA1*)及有氧呼吸有关基因(*nuoA1*, *nuoB1*, *nuoE1*, *nuoF1*, *nuoI*, *nuoL*, *nuoJ*, *fbcC* 和 *fbcF*)在 *nifA* 突变的根瘤细菌中表达量也比野生的根瘤细菌高. 总而言之, 参与基础代谢基因的表达量在野生根瘤细菌中比在 *nifA* 突变的根瘤细菌中低.

6 个与结瘤过程有关的基因(*nodF*, *nodH*, *nodQ2*, *nodB*, *nodD3* 和 *nodE*)在 *nifA* 突变的根瘤细菌中表达量比野生根瘤细菌低. 不出所料, 包括 *fixABC* 和 *nifHDK* 的大多数位于固氮基因簇的基因(*sma0810~sma0835*)在根瘤中的表达是依赖 NifA 的. 不过, *nifA* 自身的表达在 *nifA* 突变的根瘤细菌中要高于野生根瘤细菌(因为 *nifA* 基因的微阵列杂交探针杂交的序列位于插入失活位点的上游(参考材料与方法部分), 在 *nifA* 突变的根瘤细菌中可以测到 *nifA* 的转录信号). 出乎所料, 与固氮过程中电子传递有关的、位于第二个固氮基因簇(*sma1208~sma1229*)的基因(*fixG*, *fixP1*, *fixQ1*, *fixO1*, *fixN1* 和 *fixK1*), 其表达量在 *nifA* 突变的根瘤细菌中大大高于野生的根瘤细菌. 进一步地, 另一个拷贝的 *fixNOPQ* 操纵子(*sma0762~sma0769*)以及 *azul* 和 *smc02283* 等与电子传递有关的基因在 *nifA* 突变的根瘤细菌中大大高于野生的根瘤细菌.

2.2 通过报告基因融合系统验证 *fixN1* 和 *nifA* 在两种根瘤细菌中的表达差异

为了验证微阵列分析中发现的 *fixN1* 和 *nifA* 在两种根瘤细菌中的表达差异, 我们构建了启动子和β-半乳糖苷酶报告基因融合系统, 并检测了其表达活性. *PnifA::lacZ* 的表达活性在 *nifA* 突变的根瘤细菌中比在野生的根瘤细菌中高两倍; 而 *PfixN1::lacZ* 的表达活性在 *nifA* 突变的根瘤细菌中比在野生的根瘤细菌中高 3 倍(图 2). 没有启动子的空载体对照在所检测的条件下没有测出活性. 这些结果表明, 两个启动子

的表达活性在 *nifA* 突变的根瘤细菌中比在野生的根瘤细菌中高, 与微阵列实验所得出的结果是一致的.

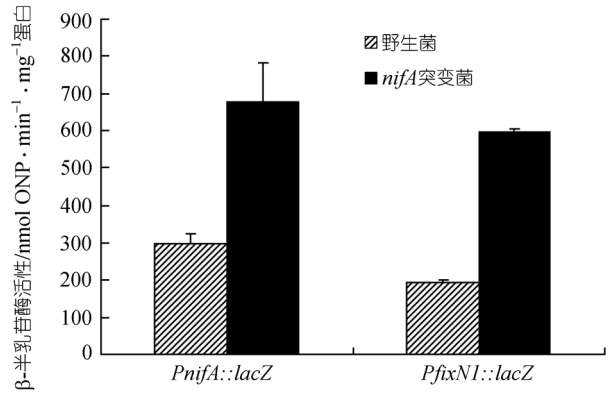


图 2 在 *nifA* 突变的根瘤细菌及野生根瘤细菌中 *PnifA::lacZ* 和 *PfixN1::lacZ* 的表达活性
每个数据是 3 个重复实验的平均值

2.3 在 *nifA* 突变的根瘤细菌中 *fixLJ* 的表达量有显著上调

利用定量实时 PCR 实验, 检测了两种根瘤细菌中 *fixK1*, *fixN1*, *fixL* 和 *fixJ* 的转录水平(图 3). 从定量实时 PCR 实验中计算出的 *fixK1* 和 *fixN1* 在两种根瘤细菌中表达量的比值与微阵列分析中所得出的比值相符. 考虑到微阵列实验和定量实时 PCR 实验中样品的获得及归一化方法都是不同的, 而且是独立进行的, 因此 *fixK1* 和 *fixN1* 在 *nifA* 突变的根瘤细菌中表达量显著上调得到了很好的验证. 不幸的是, 微阵列实验中, 检测到的 *fixL* 和 *fixJ* 的杂交信号很低, 因此在显著性统计分析中排除了. 不过, 定量实时 PCR 实验结果表明, 两个基因在 *nifA* 突变的根瘤细菌中表达量显著上调.

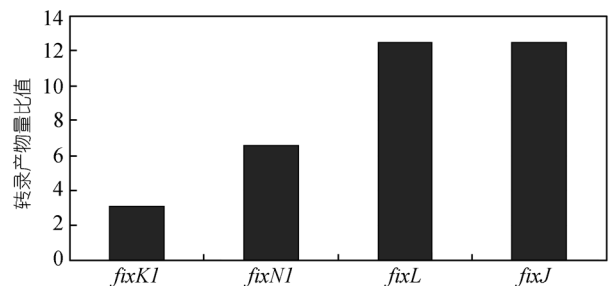


图 3 定量实时 PCR 分析 *nifA* 突变及野生根瘤细菌中 *fixK1*, *fixN1*, *fixL* 和 *fixJ* 的转录水平

16S rRNA 作为内部参照. 给出的比值是归一化之后的 *nifA* 突变的根瘤细菌和野生的根瘤细菌中的表达量比值. 相对误差在 15% 以内

2.4 在有显著表达差异的基因上游序列中可能存在 NifA 结合位点的分析

依据NCBI数据库中报道的 65 个不同的NifA结合序列, 统计出了NifA保守结合序列. 接着, 利用 Berg和von Hippel的方法 [30,31]对那些有可能带有NifA结合位点的基因的上游序列(起始密码子上游 500 碱基对以内)进行软件扫描分析. 在这个方法中, 差异能值(discrimination energy, DE)用来表征一个序列与保守序列之间的差异度, DE值越低, 成为NifA结合位点的几率越高. 在*fixL*的上游序列中没有发现可能的NifA结合位点. 这暗示着NifA缺失引起的*fixLJ*在根瘤细菌中的表达差异可能是间接的. 因此, 我们筛选出在两种根瘤细菌中表达有 5 倍差异的基因以及表达有差异的转录调控因子基因, 并对其上游序列进行分析是否有可能的NifA结合位点.

从表 2 中可以看出, 在*fixA*和*nifH*的上游序列中分析出很强的NifA结合位点, 与文献[32]报道的完全一致. 同样地, 在*sma0872* 上游序列中分析出的NifA强结合位点与文献[33]报道的一致. 有意思的是, 在转录激活因子基因*nodD3* 的上游序列中, 也分析出带有较弱的NifA结合位点. 有研究报道, 在苜蓿根瘤菌的*nodD3* 上游序列中有 3 个NtrC结合位点和下游的 σ^{54} -依赖型启动子序列 [34]. 本研究推测, NifA结合位点与第 2 个NtrC结合位点可能是重叠的.

在野生根瘤细菌中的表达量低于*nifA*突变根瘤细菌中的表达量的基因中, 有 10 个基因的上游序列中推测出有NifA结合位点. 在*nifA*的转录起始位点和起始密码子之间 [35]及*fixK1*的FixJ结合位点 [36]的上游, 发现有可能的NifA结合位点.

3 讨论

微阵列研究表明 [20,22], 类菌体与自由生长的根瘤菌相比, 整个基因组中将近 20%的基因发生显著的表达差异, 说明分化成类菌体需要经历巨大的生理生化变化. 他们提出, 类菌体中与细胞结构、能量代谢以及蛋白合成有关的基因的表达水平要低于自由生长的细菌, 说明类菌体中基础代谢水平是降低的; 而类菌体中与固氮相关的基因的大量表达从另一个角度说明类菌体中特殊的代谢状态. 在本研究中, 我们比较了野生根瘤细菌和*nifA*突变的根瘤细菌的基因表达谱差异, 发现相似的现象, 即基础代谢相关基因的表达水平总体下降, 而固氮相关基因的表达水平上调. 从基因表达分布(图 1(a))及表达差异显著的基因数目中可以知道, NifA的缺失导致了很多功能组的基因发生了表达量的差异, 可能把根瘤细菌引入完全不同的生长状态. 不过, 尽管*nifA*突变的根瘤细菌与野生根瘤细菌相比有基础代谢加快的特点, 但却不能等同为自由生长的细菌, 因为比较*nifA*突变的根瘤细菌和自由生长的细菌的转录组发

表 2 在两种根瘤细菌中表达有显著差异且上游序列含有推测的 NifA 结合位点的基因

基因	推测的 NifA 结合位点(5' 3') ^{a)}	DE ^{b)}	距离 ^{c)}	log ₂ Ratio
保守	CTT T GTCGGATATCCGACAAAG			
<i>fixA</i> ^{d)}	CTCT T GTCGGCCCCCGACAGAT	8.04	225	5.33
<i>nifH</i> ^{e)}	CCT T GTCGGCTTAGCGACACGA	3.85	173	4.25
<i>sma0872</i> ^{f)}	GTT T GTCAGGTCCGCGACAGAG	3.28	175	4.36
<i>sma1409</i>	GTTAG T TACTTACGCAACAAGA	10.00	14	2.32
<i>smb20408</i>	GGT T ATCCGCAAGCCGACATCG	10.62	230	2.70
<i>nodD3</i>	AAAT G TCAGGAATGCTCCACGC	11.99	262	1.37
<i>smc01260</i>	CTT T CTCGGCATCGCGACATGG	8.42	102	-2.37
<i>smc00320</i>	GTCC G TCTGGTACGCGACAACG	8.57	326	-3.09
<i>smc02756</i>	TCT T GTCGGACAGGCGGCAAAC	8.57	111	-2.66
<i>fixK1</i>	ACCT G TGGACTACGCGACACTA	8.95	145	-2.21
<i>nifA</i>	CCCT T GTCGTACCTTCACAAAG	9.20	58	-1.08
<i>smc02983</i>	GGCT T TGGAGAGCCGGCAGAC	10.17	268	-3.16
<i>smc01453</i>	GGT T GTCGAGACTCAGAAAGG	11.46	9	-2.94
<i>smb20766</i>	GGT T GTCGAGACTCAGAAAGG	11.46	9	-2.69
<i>fixN1</i>	GTT T GGCGCTCGCGCACACGC	11.47	34	-2.38
<i>smc01856</i>	CTCG G TCCGCAAGCGAACATCG	11.63	9	-2.35

a) 阴影显示最保守的碱基对; b) DE, 差异能值用来表征特定序列与保守的NifA结合位点的差异; c) 距离, NifA结合位点(22 碱基对)到起始密码子的碱基对数目; d)~f) 以前报道的NifA结合位点 [40,41,33]

现仍有很大的差异(结果未显示)。

以前的研究表明,多个与结瘤有关的基因在根瘤细菌中的表达要高于自由生长的细菌^[20]。本研究中,几个与结瘤有关的基因(*nodF*, *nodH*, *nodQ2*, *nodB*, *nodD3*和*nodE*)在*nifA*突变的根瘤细菌中的表达要低于野生细菌。我们推测, NifA对这些基因的表达起调控作用可能是通过*nodD3*, 因为*nodD3*的上游序列中有推测的较弱的NifA结合位点(表2), 但需要进一步的证据来支持这一调控途径的存在。在分裂根系统中的研究表明, 结瘤因子对结瘤过程起负反馈调节作用^[37]。具有超级结瘤表型的植物突变中可能缺失了这种负反馈机制^[38]。考虑到*nifA*突变导致结瘤数目比野生菌显著增多^[13,39], 上述与结瘤有关的基因在*nifA*突变的根瘤细菌中的表达下调可能与结瘤数目控制能力的下降有关。

本研究观察到2个拷贝的*fixNOQP*表达量在*nifA*突变的根瘤细菌中要显著高于野生根瘤细菌, 而大多数与共生固氮有关的基因的表达量在*nifA*突变的根瘤细菌中要低于野生根瘤细菌。还有, 受FixJ调控的*nifA*, *fixK1*和*smc03253*的表达量在无NifA时上调。这种受FixJ调控的基因的上调, 在比较*nifA*突变的根瘤细菌和质粒编码的*nifA*互补的*nifA*突变根瘤细菌的基因表达谱时, 仍可以观察得到(结果未显示)。

尽管*nifA*和*fixK1*的上游序列含有推测的NifA结合位点(表2), 主要的调控机制可能是通过上调*fixLJ*的转录水平, 进而上调了受FixJ调控的基因, 如*nifA*, *fixK*, *fixNOQP*和*smc03253*。目前, 我们还没有看到有关*fixLJ*转录调控有关的报道。需要进一步的证据来揭示这种调控机制的存在。

考虑到表达差异显著的基因数目庞大, 相对来说直接受NifA调控的基因数目较少, 我们推测NifA的调控作用是通过控制一些转录因子如sigma因子、激活蛋白或抑制蛋白的表达来得以扩展。除了前面提到的*nodD3*以外, 一个编码未知功能转录因子的基因*smc01260*值得进一步分析, 因为在*nifA*突变的根瘤细菌中其表达量显著上调(表1), 而当质粒编码的NifA互补时表达量又恢复到野生菌的表达水平(结果未显示), 另一方面其上游序列推测有较强的NifA结合位点(表2)。

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

- 1 Spaink H P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 257—288[DOI]
- 2 Oke V, Long S R. Bacteroid formation in the *rhizobium*-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 641—646[DOI]
- 3 Kaminski P A, Batut J, Boistard P, et al. A survey of nitrogen fixation by rhizobia. In: Spaink H P, Kondoros A, Hooykaas P J, et al, eds. *The Rhizobiaceae*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1998. 431—460
- 4 Soupene E, Foussard M, Boistard P, et al. Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂ fixation gene expression within the Alfalfa root nodule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 3759—3763[DOI]
- 5 Gilles-Gonzalez M A, Ditta G S, Helinski D R. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature*, 1991, 350: 170—172[DOI]
- 6 Hertig C, Li R Y, Louarn A M, et al. *Rhizobium meliloti* regulatory gene *fixJ* activates transcription of *R. meliloti nifA* and *fixK* genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1989, 171: 1736—1738
- 7 de Philip P, Batut J, Boistard P. *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4255—4262
- 8 Batut J, Daveran-Mingot M L, David M, et al. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J*, 1989, 8: 1279—1286
- 9 Fischer H M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*, 1994, 58: 352—386
- 10 Hoover T R, Santero E, Porter S, et al. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell*, 1990, 63: 11—22[DOI]
- 11 Ray P, Smith K J, Parslow R A, et al. Secondary structure and DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional activator NifA from *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 3972—3980[DOI]
- 12 Hirsch A M, Bang M, Ausubel F M. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif::Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 1983, 155: 367—380
- 13 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
- 14 Vasse J, Debilly F, Camut S, et al. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen-fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4295—4306
- 15 Barnett M J, Fisher R F, Jones T, et al. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9883—9888[DOI]

- 16 Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, et al. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9877—9882[DOI]
- 17 Finan T M, Weidner S, Wong K, et al. The complete sequence of the 1683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9889—9894[DOI]
- 18 Galibert F, Finan T M, Long S R, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 2001, 293: 668—672[DOI]
- 19 Ruberg 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 Biotech*, 2003, 106: 255—268[DOI]
- 20 Becker A, Berg aes 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
- 21 Krol E, Becker A. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272: 1—17
- 22 Barnett M J, Toman C J, Fisher R F, et al. A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16636—16641[DOI]
- 23 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
- 24 Meade H M, Signer E R. Genetic-Mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 2076—2078
- 25 Saeed A I, Sharov V, White J, et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 2003, 34: 374
- 26 Tusher V G, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 5116—5121[DOI]
- 27 Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid*, 1985, 13: 149—153[DOI]
- 28 Wang Y P, Birkenhead K, Boesten B, et al. Genetic-analysis and regulation of the *Rhizobium meliloti* genes-controlling C-4-dicarboxylic acid transport. *Gene* 1989, 85: 135—144[DOI]
- 29 Muller P Y, Janovjak H, Miserez A R, et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 2002, 32: 1372
- 30 Berg O G, von Hippel P H. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. *Trends Biochem Sci*, 1988, 13: 207—211[DOI]
- 31 Berg O G, von Hippel P H. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. . The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J Mol Biol*, 1988, 200: 709—723[DOI]
- 32 Szeto W W, Zimmerman J L, Sundaresan V, et al. A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. *Cell*, 1984, 36: 1035—1043[DOI]
- 33 Aguilar O M, Reil ander H, Arnold W, et al. *Rhizobium meliloti* *nifN* (*fixF*) gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5393—5400
- 34 Dusha I, Austin S, Dixon R. The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 179: 491—499[DOI]
- 35 Agron P G, Ditta G S, Helinski D R. Mutational analysis of the *Rhizobium meliloti* *nifA* promoter. *J Bacteriol*, 1992, 174: 4120—4129
- 36 Galinier A, Garnerone A M, Reyrat J M, et al. Phosphorylation of the *Rhizobium meliloti* FixJ protein induces its binding to a compound regulatory region at the *fixK* promoter. *J Biol Chem*, 1994, 269: 23784—23789
- 37 van Brussel A A N, Tak T, Boot K J M, et al. Autoregulation of root nodule formation: Signals of both symbiotic partners studied in a split-root system of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15: 341—349
- 38 Nishimura R, Hayashi M, Wu G J, et al. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, 2002, 420: 426—429[DOI]
- 39 Zimmerman J L, Szeto W W, Ausubel F M. Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic (Fix⁻) mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 1983, 156: 1025—1034
- 40 Earl C D, Ronson C W, Ausubel F M. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC*, and *fixX* genes. *J Bacteriol*, 1987, 169: 1127—1136
- 41 Weber G, Reil ander H, Puhler A. Mapping and expression of a regulatory nitrogen fixation gene (*fixD*) of *Rhizobium meliloti*. *EMBO J*, 1985, 4: 2751—2756

(2006-04-20 收稿, 2006-06-20 接受)