



# 苜蓿中华根瘤菌烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI1* 的功能研究

刘影, 朱家璧, 俞冠翘, 邹华松\*

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

上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

\* 联系人, E-mail: [hszou@sjtu.edu.cn](mailto:hszou@sjtu.edu.cn)

2009-06-05 收稿, 2009-07-22 接受

国家自然科学基金(批准号: 30770171)、上海市自然科学基金(批准号: 05ZR14135)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2001CB108901)资助项目

**摘要** 我们先前的工作表明, 苜蓿中华根瘤菌的烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI1* 在 *nifA* 突变根瘤中表达水平降低. 本研究构建了 *fabI1* 的定点插入突变体. 与野生型相比, 突变菌株的生长速度变慢, 在高浓度 NaCl 培养基上的生长能力降低. 在半固体培养基上, 该突变体的涌动能力完全丧失. 在共生过程中, 突变菌株在宿主植物上延迟结瘤, 形成根瘤的能力下降. 虽然苜蓿中华根瘤菌中的烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI2* 的序列与 *fabI1* 有 66% 的一致性, 但 *fabI2* 不能恢复 *fabI1* 突变体的表型, 揭示了这两个基因在功能上的差异.

**关键词**

苜蓿中华根瘤菌  
烯脂酰 ACP 还原酶  
表型  
结瘤

根瘤菌能在豆科植物上引发根瘤的形成, 并与之形成共生关系. 已经报道的众多根瘤菌共生突变体不仅对共生有影响, 细菌的生理生化过程也发生了改变, 包括中心代谢过程和细胞壁的合成<sup>[1]</sup>. 这些突变体的研究有助于进一步认识这些基因在不同共生阶段的生物学功能<sup>[2,3]</sup>.

苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 是已经被广泛认识的根瘤菌, 能与二倍体和四倍体的苜蓿植物建立共生关系<sup>[4]</sup>. 除了传统意义上的 *nif*, *fix* 和 *nod* 基因, Rm1021 中的很多基因都参与了共生关系的建立. 例如, 负责合成长链高丝氨酸内酯的 *sinRI* 基因参与控制根瘤的形成<sup>[5]</sup>. 拥有 96 个成员的 *lysR* 转录调控因子是 Rm1021 中最大的转录调控家族, 其中 *lsrA1* 和 *lsrA2* 对共生性状有调控作用. 这两个基因突变后, 细菌的固氮能力丧失, 在宿主植物根部形成不能固氮的无效瘤<sup>[6]</sup>. 最近的研究指出, Rm1021 的高度保守基因 *smc01113* 是与宿主植物建立共生关系所必需的,

而且这个基因在抵抗多种环境压力过程中起着非常重要的作用<sup>[7]</sup>.

细菌脂肪酸的合成主要是通过脂肪酸合成系统来完成的, 其中的每一个合成步骤都有相应的催化酶<sup>[8]</sup>. 脂肪酸延伸合成过程中的  $\beta$ -酮酯酰-ACP 合成酶、羟脂酰-ACP 脱水酶和烯脂酰-ACP 还原酶分别催化不同的底物.  $\beta$ -酮酯酰-ACP 由依赖 NADPH 的  $\beta$ -酮酯酰-ACP 合成酶还原<sup>[9]</sup>. 脂肪酸延伸的最后一步反应由烯脂酰 ACP 还原酶(*fabI*)催化<sup>[10]</sup>. 随着基因组测序的完成, 基因组信息揭示了根瘤菌 Rm1021 具有保守的脂肪酸合成系统, 与大肠杆菌等其他细菌有很高的同源性.

苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 有两个烯脂酰 ACP 还原酶基因, *fabI1* 由 *smc00005* 编码而 *fabI2* 由 *smc00326* 编码. 在基因组芯片杂交实验中, *fabI1* 基因在 *nifA* 突变根瘤中表达水平降低<sup>[11]</sup>. 本研究构建了 *fabI1* 基因的突变体, 对它的突变表型进行了分析, 为深入了解

**引用格式:** 刘影, 朱家璧, 俞冠翘, 等. 苜蓿中华根瘤菌烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI1* 的功能研究. 科学通报, 2009, 54: 3830~3833

Liu Y, Zhu J B, Yu G Q, et al. The enoyl-ACP reductase gene, *fabI1*, of *Sinorhizobium meliloti* is involved in salt tolerance, swarming mobility and nodulation efficiency. Chinese Sci Bull, doi: 10.1007/s11434-009-0721-2

*fabII* 的功能提供依据。

## 1 材料和方法

( ) 细菌和质粒。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  用于分子克隆; MT616 为接合实验中的帮助菌株。苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 作为野生型菌株进行 *fabII* 基因突变。自杀质粒 pK19mob2 $\Omega$ HMB 和黏粒 pLAFR3 分别用于突变体构建和功能互补分析。Luria-Bertani (LB) 培养基用于培养大肠杆菌。LB 培养基加 2.5 mmol/L MgSO $_4$  和 2.5 mmol/L CaCl $_2$  (LB/MC) 用于根瘤菌的培养。

( ) 突变体的构建。参照 Luo 等人<sup>[6]</sup>的方法构建突变体。质粒 pK19mob2 $\Omega$ HMB 经 *EcoR* 酶切, 电泳后用 PCR 纯化试剂盒回收(博大泰克, 中国)。根据 *fabII* 基因的序列设计特异性引物(5'-CGGAATTC ATGGGCGTCGCAAACAATC-3'; 5'-CGGAATTCGAC CGCCGTGAAGGAATAGA-3'), 从 Rm1021 基因组中扩增 350 bp 大小的 DNA 片段, 经 *EcoR* 酶切后连接到 pK19mob2 $\Omega$ HMB 上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。随后, 通过三亲接合实验, 将重组质粒转移到野生型 Rm1021 中, 形成具有新霉素抗性的插入突变体。为了证实自杀质粒成功插入到靶基因上, 将来自 pK19 mob2 HMB 序列的一个引物(5'-CCTGGCCTTTTGCTGGCC T-3')与构建突变体的特异性引物组合配对, 以突变体基因组为模板进行 PCR 反应。如果载体插入到靶基因 *fabII* 上, 会得到一个 1 kb 大小的 PCR 产物。这个产物的部分序列是 *fabII* 基因, 另外一部分是 pK19mob2 $\Omega$ HMB 载体序列。

( ) 在 *fabII* 突变体中组成型表达 *fabII* 和 *fabI2* 基因。根据 Rm1021 基因组序列, 设计两对特异性引物(5'-ATTCCATGGCTCAGGCATCGGGT-3', 5'-CAGTTCAAAGTGTTACAGCCGC-3'; 5'-GCCGGCGTG CAGGAATCGATCTA-3', 5'-CCGCGAAGTTGCGAAA TGGGAAA-3'), 扩增全长 *fabII* 和 *fabI2* 基因。PCR 产物分别连接到 T 载体 pGM-T 上, 经 *EcoR* 酶切后, 连接到载体 pLAFR3。重组质粒 *pFI1* 和 *pFI2* 通过三亲接合实验转入 *fabII* 突变株, 检测突变表型的恢复情况。空载体 pLAFR3 用做阴性对照。

( ) 生长实验。为检测 *fabII* 突变株的生长速率, 野生型 Rm1021 和 *fabII* 突变株分别在 LB/MC 培养基中生长到静止期, 测定菌液的  $A_{600}$  值, 调整  $A_{600} = 1.00$ 。再按 1:100 的比例转接 100 mL LB/MC 液体培养基。同时, 测定  $A_{600}$  值, 以保证同样的初始  $A$  值。样品放在 28 $^{\circ}$ C 振荡培养, 此后, 每隔 2 h 测一次  $A$  值。

在固体培养基上培养前, 细菌先在液体 LB/MC 培养基中培养到生长静止期, 按 1:100 的比例转接到 5 mL 液体 LB/MC 培养基中培养 24 h, 测定  $A_{600}$  值以后, 把所有菌液都稀释到  $A_{600} = 0.5$ 。每个样品取 1  $\mu$ L 菌液, 点到 0.5% 琼脂的 LB/MC 半固体培养基上检测细菌的涌动能。同时, 将每个样品点到 1.5% 的 LB/MC 固体培养基上, 培养基中分别加入 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 和 2.5% 的氯化钠。2 d 后观察细菌的生长情况。

( ) 结瘤实验。苜蓿种子在根瘤菌液( $A_{600} = 0.03$ )中浸泡 30 min 后, 转到蛭石:珍珠岩(2:1)中萌发。接种后, 每天每个处理取 10 株苜蓿观察结瘤情况, 总共观察 20 d。

## 2 结果

### 2.1 *fabII* 突变体构建

用 PCR 扩增 350 bp 大小的 *fabII* 部分序列, 连接到自杀质粒 pK19mob2 $\Omega$ HMB, 并得到插入突变体。挑取新霉素抗性单克隆, 提取细菌基因组作为模板。将载体序列的引物分别与构建突变的引物组合, 进行 PCR 反应。PCR 产物经测序确认, 部分序列来自靶基因 *fabII*, 部分序列来自 pK19mob2 $\Omega$ HMB, 表明 *fabII* 基因中间插入了自杀质粒。这个突变体被命名为 SmL9。

### 2.2 SmL9 的自生表型

突变体 SmL9 的生长速度如图 1 所示。与野生型相比, SmL9 的生长速度变慢。从相同的  $A$  值开始, 随后的每个检测的时间点, SmL9 的  $A$  值都比野生型菌液低。突变株 SmL9 培养 44 h 后进入生长静止期, 比野生型菌株晚 6 h。同时, 突变株的  $A_{600}$  最大值仅为 4.0, 比野生型低 4.8%。

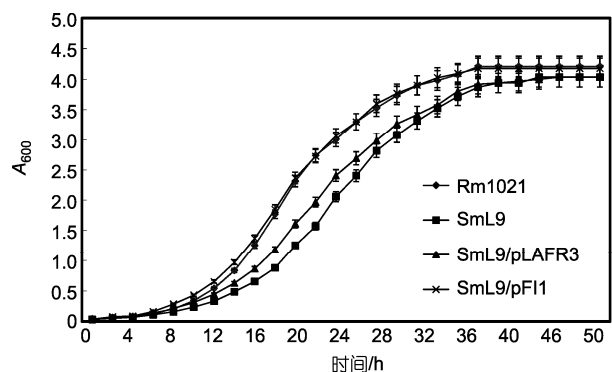


图 1 *fabII* 突变株在液体 LB/MC 培养基中的生长曲线

因为 *fabII* 基因在 *nifA* 突变根瘤中表达水平发生变化, 我们推测它可能与对细菌的抗逆有关. 因此, 我们检测了突变株在高盐浓度下的生长状况. 在 LB/MC 培养基中分别加入 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 和 2.5% 的氯化钠. 随着氯化钠浓度增加, 细菌菌落逐渐变小, 反应出在高盐浓度下, 细菌生长速度变慢. 突变株 SmL9 在 1.5% 氯化钠的 LB/MC 上仅有少许的生长, 在 2.0% 和 2.5% 氯化钠的培养基上完全不能生长. 而野生型菌株在 2.5% 氯化钠的培养基上还能生长, 表明 *fabII* 基因突变后, 细菌的耐盐能力下降(图 2).

*fabII* 基因突变后, 细菌的涌动能力丧失. 在 0.5% 琼脂培养基上培养 2 d 后, 野生型菌株 Rm1021 的菌落直径大约为 25 mm, 在菌落的周围可以看到清晰的扩散晕圈. 而突变菌株 SmL9 的菌落比野生型菌稍小, 不能产生扩散晕圈(图 3).

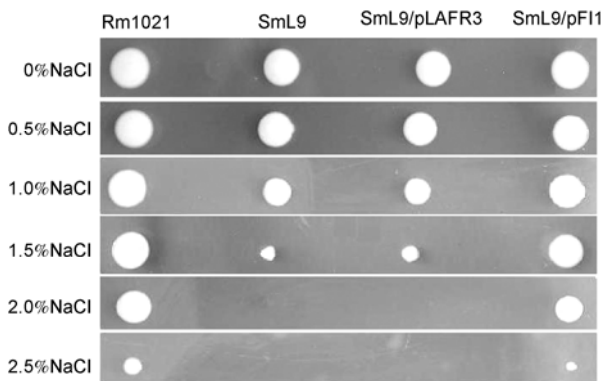


图 2 *fabII* 突变株耐盐能力检测

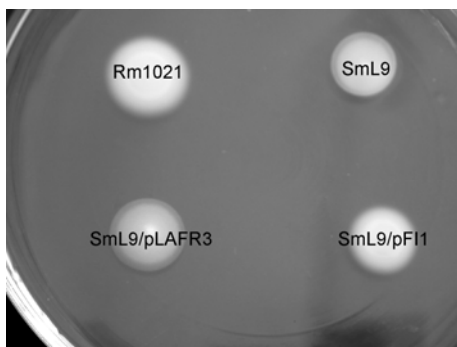


图 3 *fabII* 突变株的涌动能力

### 2.3 SmL9 的共生表型

突变株 SmL9 用来接种苜蓿植物以观察共生表型. 接种 3 周后, 未接根瘤菌的苜蓿植物生长矮小,

呈黄色, 显示植株处于缺氮状态. 接种 SmL9 的苜蓿呈绿色, 但植高仅有接种野生型菌株苜蓿的四分之三. 同时, SmL9 的根瘤比野生型小. 5 周后, SmL9 感染的苜蓿与接种野生型菌株的没有明显区别.

上述现象揭示了 *fabII* 基因突变后, 可能影响了根瘤的形成和发育. 为了证实这个推测, 我们仔细观察了突变株 SmL9 在苜蓿根部形成根瘤的情况. 接种后 3 d 内, 每种菌包括野生型菌株都没有在根部引发根瘤. 第 4 天, 野生型菌株开始形成根瘤. 随后的 5 d 时间里, 形成的根瘤的数量迅速上升, 并使所观察的植物都结瘤. 而突变株 SmL9 到第 7 天才能在苜蓿根部形成根瘤. 从第 9 天开始, 形成的根瘤数量开始缓慢增加, 直到第 17 天, 所有的植株形成根瘤(图 4). 因为结瘤延迟, SmL9 的株根瘤的大小和形态都与野生型有明显的区别, 突变根瘤都比野生型小. 接种后第 6 天, 野生型根瘤开始变红, 而突变株到第 10 天才开始变红.

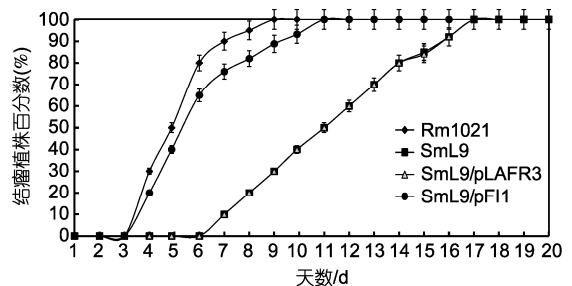


图 4 *fabII* 突变株的结瘤动力学

### 2.3 *fabII* 对 *fabI* 突变株的互补分析

苜蓿中华根瘤菌 Rm1021 的基因组包括 3 个复制子: 一个环状染色体(3.7 Mb)及两个大质粒 pSymA (1.3 Mb)和 pSymB (1.7 Mb). 除了烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabII*, Rm1021 还有一个烯脂酰 ACP 还原酶基因 *fabI2*. 这两个基因都位于环状的染色体上, *fabI2* 基因由 smc00326 编码, 与脂肪酸合成基因 *fabBA* 相邻. 烯脂酰 ACP 还原酶 和 的氨基酸序列有 66% 的一致性, 揭示了两者的催化不同的底物, 即两者在功能上有所区别. 将连接到质粒 pLAFR3 上的 *fabI2* 基因导入 *fabII* 基因突变株 SmL9 中, *fabI2* 基因不能恢复 *fabII* 基因的突变表型(图 5). 烯脂酰 ACP 还原酶 和

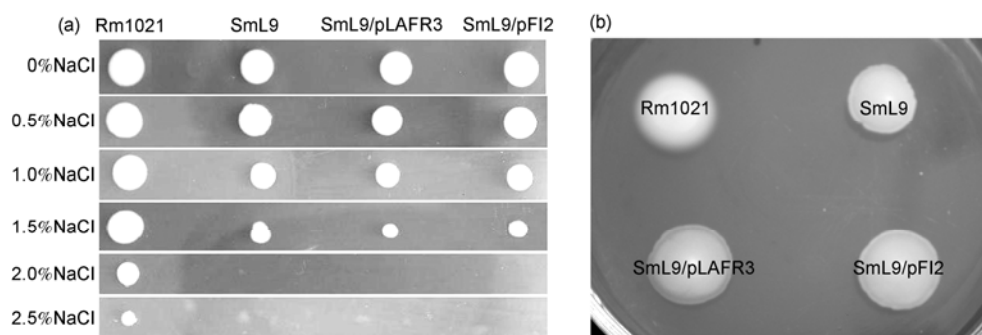


图5 *fabI2*基因对*fabI1*突变体的互补分析

(a) 耐盐能力; (b) 涌动力

在功能上的差异, 说明 Rm1021 拥有复杂的脂肪酸合成系统. 进一步研究烯脂酰 ACP 还原酶 和 的催化底物和生成的产物, 可以深入了解这两个蛋白的生物学功能.

### 3 讨论

大肠杆菌的脂肪酸组成与细菌的耐盐性相关<sup>[12]</sup>. 与脂肪酸合成相关的 *fabG* 突变后导致细菌不能在高浓度氯化钠培养基上生长<sup>[13]</sup>. 我们的研究进一步说

明脂肪酸合成与细菌的耐盐相关. 与脂肪酸合成相关的 *fabI1* 基因突变, 不仅耐盐能力下降, 细菌的生长、涌动和结瘤都受到影响, 说明苜蓿中华根瘤菌 *fabI1* 基因具有多种功能. 虽然 *fabI1* 和 *fabI2* 基因具有很高的同源性, *fabI2* 基因不能恢复 *fabI1* 基因耐盐、涌动和结瘤表型. 我们推测 *fabI1* 基因主要参与细菌对环境的适应性, 而 *fabI2* 基因维持细菌的正常生命代谢.

### 参考文献

- 1 Jones K, Kobayashi H, Davies B W, et al. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5: 619—633[doi]
- 2 Gage D J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68: 280—300[doi]
- 3 Perret X, Staehelin C, Broughton W J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64: 180—201[doi]
- 4 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
- 5 Marketon M M, Glenn S A, Eberhard A, et al. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 2003, 185: 325—331[doi]
- 6 Luo L, Yao S Y, Becker A, et al. Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *J Bacteriol*, 2005, 187: 4562—4572[doi]
- 7 Davies B W, Walker G C. A highly conserved protein of unknown function is required by *Sinorhizobium meliloti* for symbiosis and environmental stress protection. *J Bacteriol*, 2008, 190: 1118—1123 [doi]
- 8 Magnuson K, Jackowski S, Rock C O, et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 522—542
- 9 Lai C Y, Cronan J E. Isolation and characterization of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (*fabG*) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 2004, 186: 1869—1878[doi]
- 10 Bergler H, Fuchsbichler S, Hogenauer G, et al. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (FabI) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in fatty acid biosynthesis, accepts NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoyl-CoA. *Eur J Biochem*, 1996, 242: 689—694 [doi]
- 11 姚正华, 田哲贤, 戴小密, 等. 异源 *nifA* 基因对苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) *nifA* 突变体的互补分析. *科学通报*, 2006, 51: 2258—2264
- 12 McGarrity J T, Armstrong J B. The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 398: 258—264
- 13 Miller-Williams M, Loewen P C, Oresnik J J. Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiology*, 2006, 152: 2049—2059[doi]