

紫云英根瘤中特异表达 CCPs 基因的同源分析及表达定位

张晓媛 王建云 魏 丰 李振鹏 谢福莉 李友国

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 将紫云英根瘤中特异表达的编码 CCPs (cysteine cluster protein) 同源多肽的蛋白 AsF259 在大肠杆菌表达菌株(DH10B)中进行体外诱导表达, 分别检测其在洋葱表皮细胞与紫云英根瘤中的细胞定位, 并利用免疫荧光技术, 检测紫云英中 AsF259 基因的时空表达特征。结果表明: AsF259 蛋白分布于洋葱表皮的细胞壁、细胞膜、细胞质; 基因表达和融合蛋白定位实验显示, AsF259 在根瘤中呈特异性表达, 在类菌体分化前期大量表达, 且 AsF259 蛋白与类菌体共定位, 表明 AsF259 基因属于 NCR 家族, 在类菌体分化、维持和共生固氮过程发挥重要作用。

关键词 紫云英; 根瘤菌; 共生固氮; CCPs; AsF259; 类菌体; NCR 家族

中图分类号 S 154.38⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0048-08

早期研究表明, 根瘤菌-豆科植物共生体系中多糖类信号分子(主要有 Nod 因子和表面多糖)和植物激素占有主导地位^[1], 近期研究发现转脂蛋白^[2]和其他相关基因^[3]在共生固氮过程中发挥重要作用。而植物多肽作为另外一类主要的信号分子对于根瘤的形成^[4]、侵染以及类菌体的分化具有重要作用^[5]。主要的植物多肽有 Enod40、CLE、GRP 及 NCR^[6]。NCR (nodule-specific cysteine-rich) 是 IRLC 类植物中一种特殊的多肽, 在类菌体的分化过程中发挥关键作用, 如调控类菌体细胞体积的增大^[7]、细胞膜通透性增加等^[8]。Van de Velde 等^[5]揭示不定型根瘤中一种特异的富含半胱氨酸抗菌肽类物质, 可定向地进入根瘤菌细胞膜和细胞质, 从而影响类菌体分化发育。

笔者所在课题组前期比较了紫云英接种根与不接种根在转录水平上的差异, 通过抑制差减杂交技术, 建立了紫云英共生结瘤过程中的差异表达基因文库。前期分离获得了编码 CCPs 同源多肽的 11 个基因, 包括 AsA257、AsC2411、AsIIA255、AsIIC2512、AsF259、AsG2411、AsG257、AsD255、AsIC258、AsA244 和 AsD2410。经过生物信息学分析发现, 它们编码

的多肽序列均较短(58~126 氨基酸), N-端包含 1 个保守的信号肽, C-端部分则具有 2 个保守的半胱氨酸簇: Cys-X₄-Asp-Cys 和 Cys-X₄₋₅-Cys (图 1)。这些结构特点都与 CCPs 家族中的特殊成员 NCR 高度一致。其中基因 AsF259 在紫云英根瘤中特异性表达, 多肽结构与苜蓿 NCR 基因十分相似。为确定其是否属于 NCR 基因, 本研究进行了 CCPs 基因的同源分析及表达定位。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用主要菌株: 华癸中慢生根瘤菌 7653R (*Mesorhizobium huakui* 7653R)、根瘤农杆菌 EHA105、发根农杆菌 K599、大肠杆菌 DH10B、植物双元表达载体 PBI121; RNA 抽提试剂 Gateway BPclonase、Trizol reagent; 用到的限制性核酸内切酶、反转录酶均为 Fermentas 公司产品; 荧光定量试剂盒为 SYBR Green real-time PCR Master Mix; 抗生素氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素等来自 Duchefa 公司产品。

主要仪器: PCR 仪为 Bio-Rad 生产, Step one

收稿日期: 2015-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371549); 国家“973”计划项目(2010CB126502); 教育部博士点基金项目(20110146110012)

张晓媛, 硕士研究生, 研究方向: 根瘤菌共生固氮体系分子机制, E-mail: xiaoyuan0321smile@163.com

通信作者: 李友国, 博士, 教授, 研究方向: 生物固氮、农业环境微生物, E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

Real-time PCR system 购自 ABI。

1.2 紫云英根瘤组织材料的提取及 RNA 的抽提

第1天挑选粒大饱满的紫云英种子,首先用95%乙醇浸泡5 min后,5%NaClO反复冲洗表面消毒10 min,最后用无菌水洗涤10次左右并于培养箱中浸泡4~6 h,待种子吸胀,将洗好的种子均匀平铺于素琼脂平板,28℃培养箱中倒置催芽2 d。胚根长至1 cm左右时,从素琼脂平板中移出种子,接种于灭菌培养箱中进行培养,约1周后接种华癸中慢生根瘤菌 *M. huakui* 7653R。

根据试验需要收集不同时间段的根、茎、叶、瘤,用 Trizol 试剂提取总 RNA,并加用 DNaseI 处理后置于-80℃冻存备用。

1.3 AsF259 大肠杆菌表达载体的构建

以接种 *M. huakui* 7653R 的根瘤组织提取物总 RNA 作为模板,进行反转录得到 cDNA。以引物 5'-CGGACCGGTATGTTGTAATTATG-3' 和 5'-CGCG-GATCCTATTTTCTGACTTAG-3' PCR 扩增基因 AsF259 编码区序列后,回收 DNA 扩增产物成功连入载体 pMD18-T,用 *Bam*H I 和 *Age* I 双酶切插入载体 pBRed,构建重组表达载体。

1.4 紫云英各组织提取和实时荧光定量 PCR 流程

分别收取紫云英接种根瘤菌 18、28、34 d 后去瘤的根、茎、叶、瘤及 9、12、15、18、21、28、34 d 的根瘤,提取 RNA,进行反转录得到 cDNA,进行荧光定量 PCR,比较基因表达量。

用普通 PCR 方法来检测引物(扩增应得到单一、明亮的条带);用 DEPC 稀释以调整各样品浓度,并用实时荧光定量 PCR 方法检测;按照 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO)说明书配制 Real-time PCR 反应体系。反应条件:95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 59℃ 20 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。Real-time PCR 上游引物:5'-GCTATTTTATTTTC-CCTACTTC-3', 下游引物:5'-CTCCCTCTATG-CACCTTTAT-3'。

1.5 洋葱表皮细胞亚细胞定位

在超净台中,解剖刀用乙醇灼烧灭菌后,迅速切取表面积 1.0 cm² 左右的洋葱块,进行如下处理:

1) 灭菌处理。置于 75%乙醇中消毒 1 min, MS 培养基中冲洗 1 次, 2% NaClO 消毒 2 min, 之后 MS 冲洗 3~4 次。

2) 脱水处理。灭好菌的洋葱组织块放入 4 mol/L NaCl 高渗溶液中脱水处理 20 min 后,用

无菌水冲洗 1 次,迅速置于侵染菌液中。

3) 制片观察。用电转化法将 DsRed 融合表达载体和空载体分别转入根瘤农杆菌 EHA105,在含有卡那霉素和链霉素双抗的 LB 平板上进行阳性筛选。2 d 后于超净台挑取含有目的基因的农杆菌单菌落至 50 mL LB 液体培养基中, 28℃ 200 r/min 摇瓶过夜;待菌落长成后,高速离心收集菌液,弃去上清液,用 20 mL 的 1/2 MS 液体培养基重新悬浮菌体,加入 20 μL 的 100 mmol/L As 后, 28℃ 200 r/min 摇床继续培养 3~4 h;取出摇瓶,加入 2 μL 的 Silwet L-77 表面活性剂,于超净台倒入培养皿中,然后将待处理洋葱块置于培养皿中侵染 90 min 后取出,置于无菌纸上吸干表面菌液,分离出下表皮,平铺于不含抗性的 MS 固体平板上 28℃培养箱中暗培养 24~36 h;将共培养 36 h 的洋葱组织取出,无菌水冲洗 2~3 次,制作切片于激光共聚焦显微镜下观察。

1.6 发根农杆菌介导的紫云英转化实验

构建 DsRed 融合表达载体,利用电转化法转入发根农杆菌 K599,通过含有卡那霉素和链霉素的双抗 LB 平板筛选,挑选阳性克隆。活化含有目的基因的农杆菌菌株 K599,用 LB⁻ + Str + Kan 的液体培养基培养, 28℃ 200 r/min 摇床震荡培养 24 h,以 1%的接种量接种到 50 mL LB⁻ 中扩大培养约 6 h,使最终 *D*₆₀₀ 达到 0.8~1.0。种子培养 1 周后剪去下胚轴以下部分,获得外植体,在目的菌液中浸泡 10 min 后捞出,吸去多余菌液,将外植体均匀铺于素琼脂平板上, 22℃培养箱共培养 3 d。共培养后,将外植体在无菌水中冲洗 1 次,插入含羧苄青霉素的无菌 MS 固体平板上, 22℃培养箱培养 3 周后可见明显毛根。

挑选长势较好的阳性苗种于灭菌花盆中,花盆外包一层保鲜膜。紫云英饥饿培养 3~5 d 后,活化培养接种根瘤菌 *M. huakui* 7653R,以后每隔 1 d 浇以无氮营养液。

2 结果与分析

2.1 紫云英候选 NCR 基因的比较分析

选择与调控苜蓿根瘤菌类菌体分化有关的宿主植物 NCR 已知基因 18 个^[5],与获得的 11 个紫云英 *CCPs* 基因进行同源比较,进行基于编码多肽氨基酸序列的多重比对(图 1),构建系统发育树(图 2)。结果显示:调控类菌体分化的 NCR AMPs 可划分为 4 个

亚组 (Subset A-D), 11 个 CCPs 分别定位于其中的 AsG2411 3 个典型代表。表明分离获得的 11 个 CCPs Subset B、C、D 中, 并且分别包含 AsD2410、AsA244、就是根瘤中特异表达的 NCR 家族新成员。

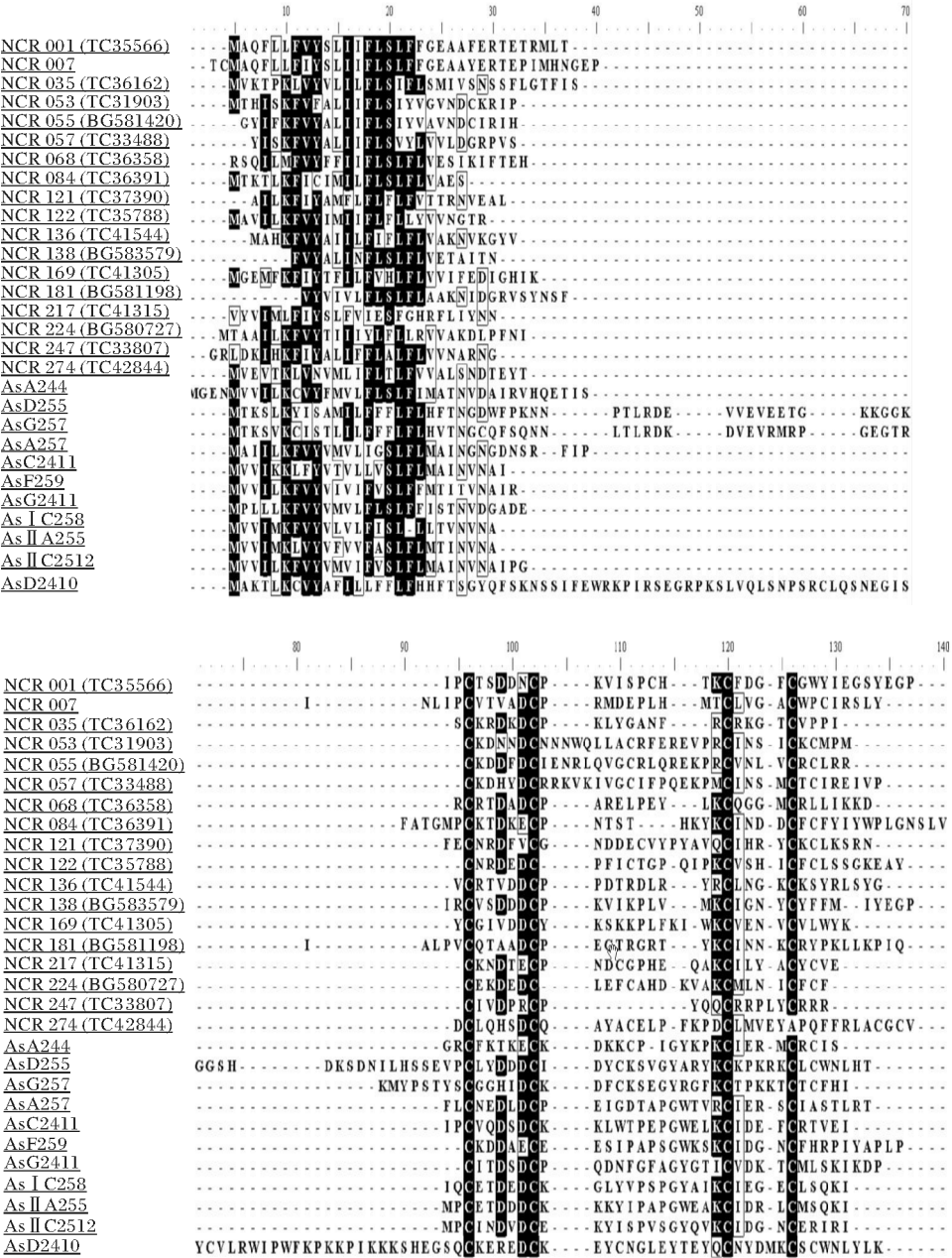


图 1 紫云英根瘤中 11 个 CCPs 与已知 NCR 氨基酸序列^[5]相似性比对

Fig.1 The homology comparison of 11 CCPs and known NCR genes basing on their amino acid sequences

2.2 AsF259 基因时空表达特征

1)AsF259 基因在紫云英不同组织中表达特征。由图 3 可见,AsF259 仅仅在不同时期的根瘤中特异表达,接受根瘤菌的诱导。在不接种根瘤菌诱导的宿主植物的根、茎、叶中均不表达。

2)AsF259 基因在根瘤发育过程中的表达特

征。进一步检测该基因在根瘤发育不同时期的动态表达特性(图 4),结果显示,紫云英 AsF259 基因在 12 d 时表达量达到最高,而该时期正是类菌体分化关键时期。12 d 后,NCR 基因呈现不同水平的持续表达,表明其在类菌体维持和固氮过程也发挥重要作用。

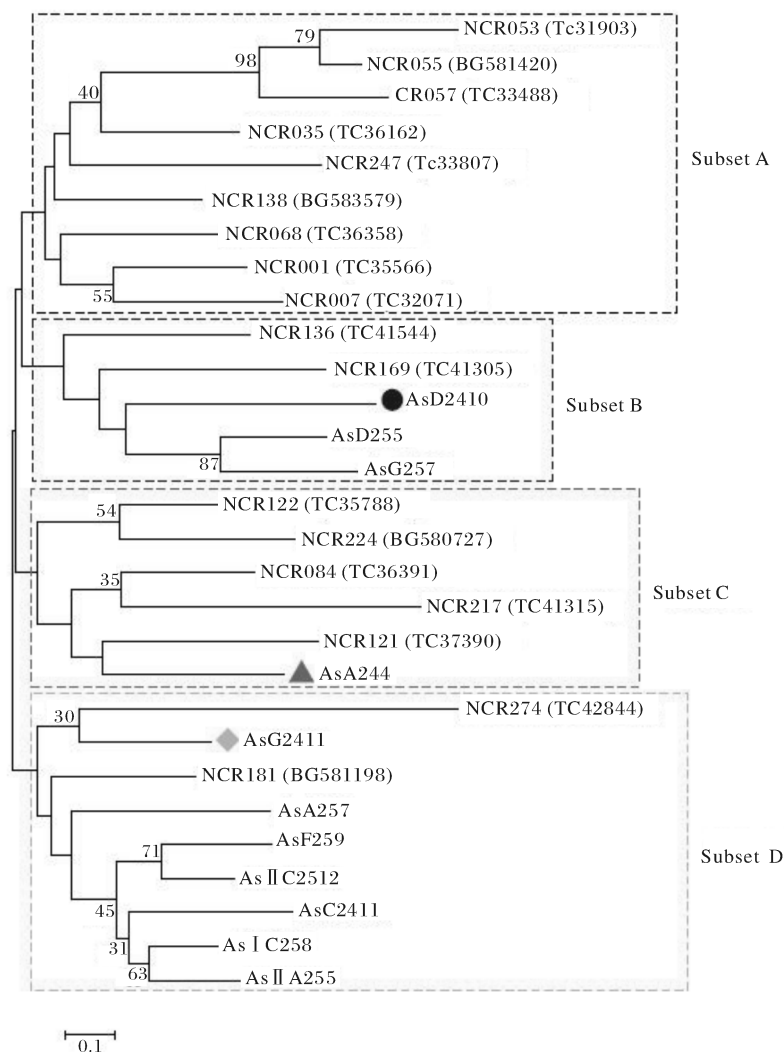
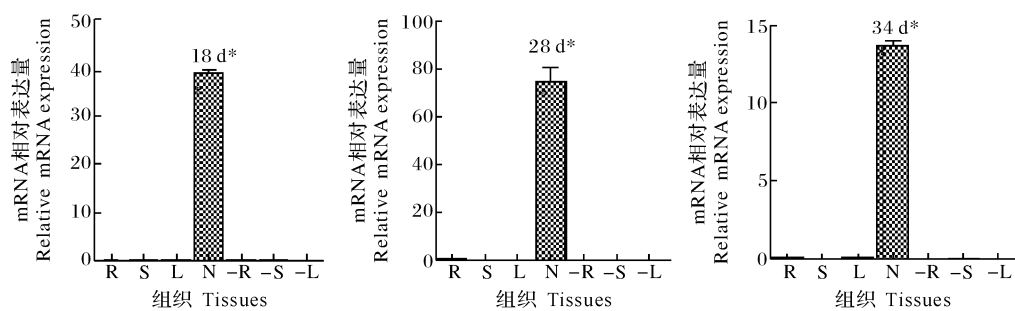


图 2 NCR 遗传系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of the NCR proteins



R:根 Root; S:茎 Stem; L:叶 Leaf; N:瘤 Nodule; -R:未接菌根 Root without inoculation with bacteria; -S:未接菌茎 Stem without inoculation with bacteria; -L:未接菌叶 Leaf without inoculation with bacteria.

图 3 *AsF259* 基因在接种根瘤菌后 18、28、34 d 紫云英不同组织中的表达特征

Fig.3 Expression of *AsF259* mRNA of different tissues in *Astragalus sinicus* L.

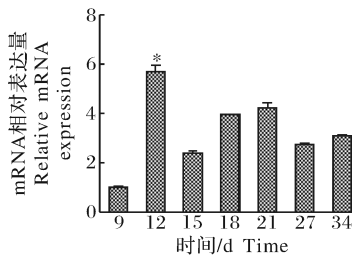


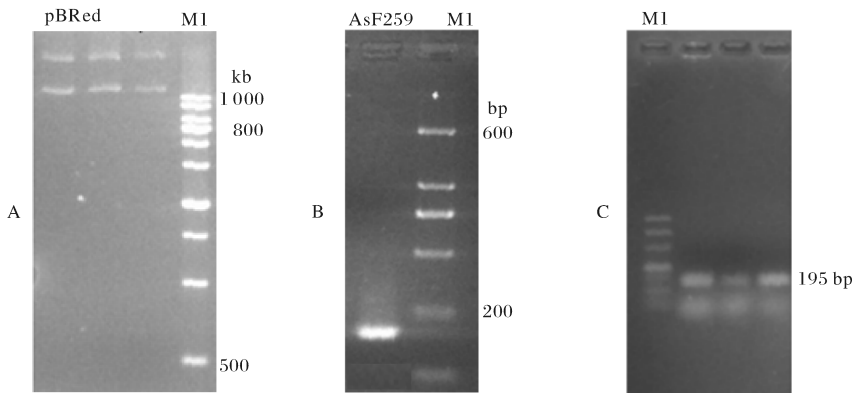
图 4 AsF259 基因在紫云英根瘤发育过程中的表达特征
Fig.4 Expression of AsF259 mRNA of the nodules in Astragalus sinicus L.

2.3 AsF259 基因融合表达载体的构建

采用笔者所在实验室已构建好的带有红色荧光蛋白的 pBRed 质粒作为表达载体,用 *Age* I 和 *Bam*H I 双酶切,扩增带有酶切位点的目的基因 *AsF259*,将目的基因构建到 pBRed 质粒载体上,转入大肠杆菌 DH10B,涂布于卡那霉素抗性 LB 平板上,筛选阳性克隆,抽提质粒,电转化根癌农杆菌 EHA105,涂布卡那霉素抗性和链霉抗性 LB⁻ 平板。

2.4 AsF259 蛋白的洋葱表皮细胞亚细胞定位

试验中,正对照取位于细胞膜上的二磷酸核苷



A:pBRed 质粒, 14 006 bp; B: AsF259 基因全长(195 bp); C:菌落 PCR 验证 A:pBRed plasmid,14 006 bp; B:AsF259(195 bp); C:Bacteria colony-PCR.

图 5 AsF259 基因融合表达载体的构建
Fig.5 The construction of expression vector

磷酸酯酶 PPD 蛋白,负对照取带有红色荧光蛋白的 PBI121 空载体。结果显示:AsF259 蛋白分布于洋葱细胞的细胞壁、细胞膜与细胞质中(图 6)。

2.5 AsF259 蛋白在紫云英根瘤中的定位

选用 *Age* I 和 *Bam*H I 双酶切载体并回收。将目的基因 *AsF259* 构建到带有 DsRed 的载体 pBR257 上,通过酶切验证阳性转化子正确,将整合质粒电转化到农杆菌 K599。

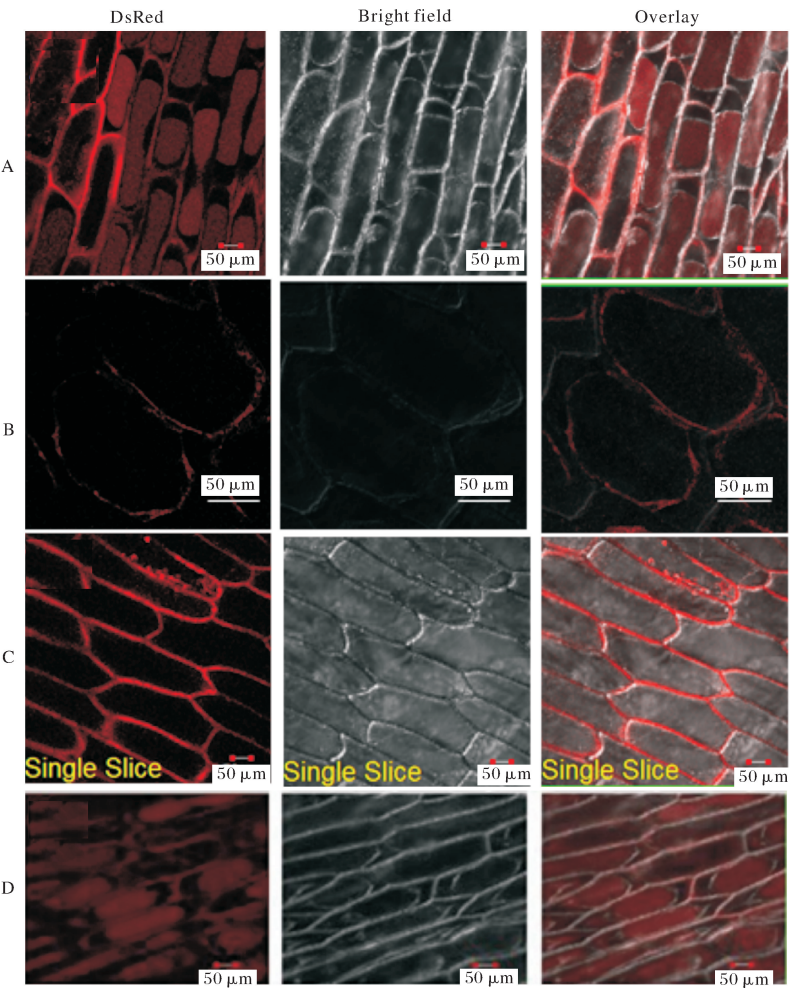
利用植物毛根转化的方法,发根农杆菌侵染紫云英幼苗愈伤组织,MS 培养基上共培养 3 d 后,无菌水冲洗紫云英幼苗,进行脱菌。待长出新的毛根后,移栽沙钵。4~5 d 后接种带有绿色荧光蛋白的根瘤菌,收集 30 d 的根瘤进行切片制作,激光共聚焦显微镜下观察。结果显示:AsF259 蛋白与类菌体共定位(图 7)。

3 讨论

NCR 基因只存在于 IRLC (inverted repeat-

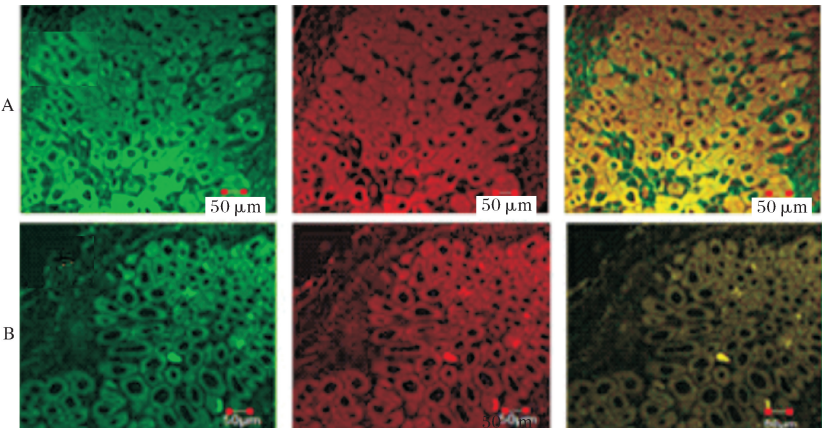
lacking clade) 类豆科植物中,形成不定型根瘤^[10],如苜蓿 (*Medicago*)^[8]、豌豆 (*Pisum*)^[11]、紫云英 (*Astragalus*)^[12]。在苜蓿中,NCR 基因分子质量小且通常编码 2 个外显子,即编码一段保守的信号肽与一段成熟多肽^[13]。笔者所在实验室获得的编码 CCPs 同源多肽的 11 个基因编码的多肽序列均较短(58~126 氨基酸),N-端包含 1 个保守的信号肽,C-端部分则具有 2 个保守的半胱氨酸簇:Cys-X₄-Asp-Cys 和 Cys-X₄₋₅-Cys。这与苜蓿^[8]NCR 基因的结构相似。同时,本研究显示 *AsF259* 基因组织表达特征表现为在根瘤中特异性表达,而在根、茎、叶中不表达或表达量极低;通过构建系统发育树,11 个紫云英 NCR 基因分属于 3 个 NCR subset,其中 *AsF259* 等 9 个基因归类于 subset D。

苜蓿 NCR 基因在类菌体分化的前期和后期被激活^[11],并且 NCR 多肽为后续的一类菌体分化所必需^[14]。紫云英 *AsF259* 基因均在 12 d 时表达量迅速达到最高,而该时期正是类菌体分化关键时期,这



A:对照 pBRed,分布于整个洋葱细胞内; B:对照 PPD,定位于洋葱细胞膜; C:AsF259 蛋白表达定位,质壁分离前; D:AsF259 蛋白表达定位,质壁分离后,分布于洋葱细胞的细胞壁,细胞膜与细胞质中。A:Control,location of pBRed in the whole cell; B:Control,location of PPD in the cell membrane; C:Location of AsF259 (before plasmolysis) in the cell membrane and cell wall; D:Location of AsF259 (plasmolysed) in the cytoplasm,cell membrane and cell wall.

图 6 AsF259 蛋白在洋葱表皮细胞内定位
Fig. 6 The localization of AsF259 in the onion



A:pBRed 蛋白分布于整个根瘤细胞内; B:AsF259 蛋白在根瘤细胞内与类菌体共定位。A:Location of pBRed in whole nodule cell; B:Co-localized of AsF259 with bacteroid.

图 7 AsF259 蛋白在根瘤细胞内定位
Fig. 7 The localization of AsF259 proteins in the nodules

个基因的高水平表达反映了 AsF259 在这一时期的关键作用。12 d 后, *NCR* 基因呈现不同水平的持续表达, 暗示其在类菌体维持和固氮过程也发挥重要作用。

苜蓿 *NCR247* 基因只在根瘤中表达^[15], 并且 *NCR247* 与 *GUS* 报告基团的融合表达显示, *NCR247* 在根瘤切片中位于 II 区以及 II-III 区的中间带, II 区的共生体停止分裂, 细胞开始延长, 而在 II-III 的中间带, 共生体迅速生长^[16]。AsF259 在根瘤中也表现出与根瘤菌类菌体共定位的特征, 与报道的 *NCR* 定位特征相同。

在豆科植物不定型根瘤中, 类菌体具有细胞伸长、基因组加倍、膜通透性改变、细菌失去分裂繁殖能力等特点^[17]。在百脉根(缺少 *NCR* 基因和终极类菌体分化)中人为表达 *NCR035* 基因可以诱导其形成终极分化的类菌体^[18]。而且, FITC(fluorescein isothiocyanate)标记的 *NCR* 多肽累积于细菌分裂板, 这暗示 *NCR* 多肽可能与细菌分裂器发生相互作用^[19]。苜蓿根瘤菌培养物在体外经过 *NCR* 多肽处理后, 可诱导膜损伤和通透性^[20], 也可诱导类似类菌体分化的表型特性^[21]。不定型根瘤类菌体分化是一个复杂、有序的过程^[22]。紫云英-华癸中慢生根瘤菌互作形成不定型根瘤, 预示着紫云英 *NCR* 可能也具有调控类菌体分化的功能。

参 考 文 献

- BAHYRYCZ A, KONOPINSKA D. Plant signalling peptides; some recent developments[J]. *Journal of Peptide Science*, 2007, 13(12):787-797.
- 李一星, 王建云, 李友国, 等. 紫云英非特异性转脂蛋白 AsIB259 的体外酶活性及在共生固氮中的功能[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3):19-25.
- 李一星, 吴梅, 李友国. 紫云英根瘤中共生固氮下调表达基因的分离与初步分析[J]. *湖北农业科学*, 2014(4):1684-1689.
- BADER M W, SANOWAR S, DALEY M E, et al. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase[J]. *Cell*, 2005, 122(3):461-472.
- VAN-DE-VELDE W, ZEHIROV G, SZATMARI A, et al. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis[J]. *Science*, 2010, 327(5969):1122-1126.
- BROGHAMMER A, KRUSELL L, BLAISE M, et al. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(34):13859-13864.
- MAUNOURY N, REDONDO-NIETO M, BOURCY M, et al. Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3):e9519.
- CATOIRA R, GALERA C, DE BILLY F, et al. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway[J]. *The Plant Cell Online*, 2000, 12(9):1647-1665.
- COMBIER J P, KÜSTER H, JOURNET E P, et al. Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(8):1118-1127.
- BARNETT M J, FISHER R F. Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis[J]. *Symbiosis (Rehovot)*, 2006, 42(1):1-24.
- UDVARDI M, POOLE P S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64(1):781-805.
- VANDECANDELAERE I, SEGAERT E, MOLLIKA A, et al. *Leisingera aquimarina* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm, and emended descriptions of *Leisingera* methylohalodivorans[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(12):2788-2793.
- WANG D, GRIFFITTS J, STARKER C, et al. A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis[J]. *Science*, 2010, 327(5969):1126-1129.
- STREETTER J. Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems[J]. *Symbiosis*, 1995, 19:175-196.
- FERGUSON B J, INDRASUMUNAR A, HAYASHI S, et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(1):61-76.
- CHARON C, SOUSA C, CRESPI M, et al. Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti* [J]. *The Plant Cell Online*, 1999, 11(10):1953-1965.
- COLEBATCH G, DESBROSSES G, OTT T, et al. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(4):487-512.
- DING Y, OLDROYD G E. Positioning the nodule, the hormone dictum[J]. *Plant Signal Behav*, 2009, 4(2):89-93.
- DENARIE J, DEBELLE F, PROMÉ J C, et al. *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, 65(1):503-535.
- FRUGIER F, KOSUTA S, MURRAY J D, et al. Cytokinin: secret agent of symbiosis[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(3):115-120.
- GULTYAEV A P, ROUSSIS A. Identification of conserved

secondary structures and expansion segments in enod40 RNAs [22] ENDRE G, KERESZT A, KEVEI Z, et al. A receptor kinase reveals new enod40 homologues in plants[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3144-3152.

gene regulating symbiotic nodule development[J]. Nature, 2002, 417(6892): 962-966.

Phylogenetic analysis, gene expression and protein localization of
a nodule-specific *CCPs* gene identified in *Astragalus sinicus* L.

ZHANG Xiaoyuan WANG Jianyun WEI Feng LI Zhenpeng XIE Fuli LI Youguo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract The nodule-specific expressed protein AsF259 which are homologous to the *CCPs* was identified in *Astragalus sinicus*, expressed in *Escherichia coli* (DH10B) to study the subcellular localization in onion epidermal cell and in *Astragalus sinicus* nodule. The real time qPCR was used to analyze the gene expression. Results showed that AsF259 protein was distributed in the cell wall, cell membrane and cytoplasm, and highly nodule-specific expressed in the nodules with the highest expression level during the crucial stage of bacteroids differentiation. AsF259 protein was co-localized with the bacteroids, indicating that AsF259 gene belongs to a novel member of NCR family and may play an important role in bacteroids differentiation, maintenance and nitrogen fixation.

Keywords *Astragalus sinicus* L.; rhizobium; symbiotic nitrogen fixation; *CCPs*; AsF259; bacteroid; NCR family

(责任编辑: 张志钰)