

苜蓿根瘤菌 17560 细胞膜膜脂组成分析及 DGTS 合成基因克隆与表达

刘华伟^{1,3} 马晓彤² 王旭明¹ 李秀爱¹ 邹小琳¹ 孙建光^{2*} 高俊莲^{1*}

(1. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心 农业基因资源与生物技术北京市重点实验定 北京 100097)

(2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业部作物营养与施肥重点实验室 北京 100081)

(3. 北京联合大学 生物化学工程学院 北京 100023)

摘要: 【目的】分析一株分离自黑龙江省的苜蓿根瘤菌在低磷胁迫及正常磷含量条件下细胞膜脂的组成, 并从该菌中克隆和鉴定细胞膜无磷脂二酰基甘油三甲基高丝氨酸(DGTS)合成基因。【方法】分别在不同磷含量的 Sherwood 基本培养基中进行根瘤菌培养, 采用 Bligh-Dyer 方法提取细胞膜脂, 以文献报道 *Sinorhizobium meliloti* (苜蓿中华根瘤菌) 菌株 1021 的脂类图谱和磷脂 PE、PG、PC 标准品作为参照, 利用薄层层析方法分析不同磷含量条件下培养菌株的细胞膜脂组成。根据 GenBank 中已发表的 DGTS 合成基因 *btaA* 和 *btaB* 序列设计引物, 以产 DGTS 菌株基因组 DNA 为模板, 扩增 *btaA* 和 *btaB* 同源基因, 并在 *E. coli* BL21(DE3) 表达。同时检测表达菌株是否合成细胞膜无磷脂 DGTS 以验证基因功能。对菌株 17560 进行 16S rRNA 基因序列分析。【结果】分离自黑龙江省的苜蓿根瘤菌 17560 与 *Sinorhizobium meliloti* 的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.8%, 但其细胞膜脂组成明显不同于参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的膜脂组成。在低磷胁迫条件下, 该菌株的细胞膜脂主要由 OL 和 DGTS 等无磷脂组成, 但 OL 的组成明显不同, 该菌株含有 3 种不同类型的鸟氨酸脂(OLs), 而参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 只含有一种类型的鸟氨酸脂(OL)。在正常磷含量条件下, 该菌株的细胞膜脂主要由 PE 和一种未知的含氨基磷脂组成, PG 与 PC 的含量均较少, 而参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的细

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970083)

*通讯作者: 高俊莲: Tel: 86-10-51503834; Fax: 86-10-51503834; 信箱: gaojunlian@baafs.net.cn

孙建光: Tel: 86-10-82108701; Fax: 86-10-82106239; 信箱: jgsun@caas.ac.cn

收稿日期: 2012-09-05; 接受日期: 2012-11-13

胞膜脂主要由 PE、PG 与 PC 组成。通过 PCR 扩增从产 DGTS 菌株 17560 中获得 1 913 bp DNA 片段, 经序列分析发现其中有两个 ORF 与菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的 *btaA* 和 *btaB* 基因序列相似性均为 99%。将该 DNA 片段克隆于 pET-30a(+) 得到重组质粒 pLH01, 转化宿主菌获得表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pLH01, 经 IPTG 诱导后产生相对分子量约为 45 kD 和 25 kD 的蛋白。薄层层析验证重组菌细胞膜脂组成, 结果表明, 表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 可以在 IPTG 诱导后合成无磷脂 DGTS, 而转入空载体 pET-30a(+) 的阴性对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+) 则不能合成。【结论】系统发育地位相同的苜蓿根瘤菌株的细胞膜脂组成明显不同; 苜蓿根瘤菌的细胞膜组成随培养基中的磷含量不同而变化, 低磷胁迫条件下其细胞膜脂主要由 OL 和 DGTS 等无磷脂组成; 在 *Sinorhizobium* 膜脂中首次发现一种未知的氨基磷脂及 3 种不同类型的鸟氨酸脂(OLs); 从菌株 17560 中克隆获得 2 个 DGTS 合成基因 *btaA* 和 *btaB*, 在大肠杆菌中成功表达, 并证实了所表达基因的功能。

关键词: 苜蓿根瘤菌, 细胞膜无磷脂, DGTS, 薄层层析, *btaA* 和 *btaB* 基因克隆与表达

Membrane lipids analysis of a bacterial strain 17560 isolated from nodule of *Alfalfa* and cloning and expression of the genes for diacylglyceryl trimethylhomoserine (DGTS) biosynthesis

LIU Hua-Wei^{1,3} MA Xiao-Tong² WANG Xu-Ming¹ LI Xiu-Ai¹
ZOU Xiao-Lin¹ SUN Jian-Guang^{2*} GAO Jun-Lian^{1*}

- (1. *Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing Municipal Key Laboratory of Aricultural Gene Resources and Biotechnology, Beijing 100097, China*)
- (2. *Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization of Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China*)
- (3. *College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China*)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to analyse membrane lipids composition of a rhizobial strain isolated from nodule of *Alfalfa* in Heilongjiang province under phosphorus-limited condition and to clone and identify the genes required for diacylglyceryl trimethylhomoserine (DGTS) biosynthesis. **[Methods]** The rhizobial strain was cultured in Sherwood minimal medium containing either normal or low concentrations of inorganic phosphate. The membrane lipids were extracted by Bligh-Dyer method and were analysed by thin-layer chromatography (TLC) using both the lipids of *Sinorhizobium meliloti* 1021 and standard samples of some phospholipid as a reference. PCR primers was designed according to the sequences of *btaA* and *btaB* in the GenBank. The PCR-amplified *btaA* and *btaB* genes were

expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The gene function was verified by testing DGTS production. 16S rRNA gene sequences of the strain 17560 was analysed. **[Results]** The strain 17560 isolated from *Alfalfa* in Heilongjiang province shares 99.8% 16S rRNA gene sequence identity with *Sinorhizobium meliloti*. But its lipid compositions were quite different from that of the reference strain *S. meliloti* 1021. Under phosphorus-limited conditions, the main membrane lipids of the strain 17560 were phosphorus-free lipids, such as ornithine lipid (OL) and DGTS. Strain 17560 contain three different types of OLs meanwhile *S. meliloti* 1021 contain only one type of OL. Under normal phosphorus condition, the main membrane lipids of strain 17560 were phospholipid, such as phosphatidylethanolamine (PE) and one unknown amino-containing phospholipid, while the main membrane lipids of *S. meliloti* 1021 are PE, phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylglycerol (PG). *BtaA* and *btaB* genes of strain 17560 were amplified. One PCR product of 1 913 bp was obtained, which contains two ORFs sharing 99% sequence identity with *btaA* and *btaB* genes of *S. meliloti* 1021 respectively. This DNA fragment was cloned to pET-30a(+) vector and transferred to *E. coli* BL21(DE3). The proteins of 45 kD and 25 kD were detected, and TLC analysis further revealed DGTS production in the expression strain when induced with isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG). **[Conclusion]** Membrane lipids of rhizobial strains from *Alfalfa* could be quite different although their phylogenetic position were the same. Membrane lipids of rhizobial strain varies with the phosphorus content in the growth medium, the main membrane lipids of the strain were phosphorus-free lipids, such as OL and DGTS under phosphorus-limiting condition. One unknown amino-containing phospholipid and three different types of OLs was found in *Sinorhizobium*. The *btaA* and *btaB* genes were cloned and expressed successfully in *E. coli*.

Keywords: Rhizobia from *Alfalfa*, Phosphorus-free membrane lipids, Diacylglyceryl trimethylhomoserine, Thin-layer chromatography (TLC), Cloning and expression of *btaA* and *btaB* genes

磷对于整个农业生产具有非常重要的影响。土壤缺磷及磷矿资源衰竭等问题对农业生产造成了严重影响。我国约0.8亿 hm^2 的耕地中,约有50%–70%的耕地缺乏有效磷^[1]。长期不合理使用化学磷肥造成土壤结构破坏和水源污染,同时生产化肥的原料和石油能源资源有限,依赖有限的资源终究难以维持农业的持续发展。根瘤菌是发展可持续农业中的一个极为重要的微生物种质资源,不仅可以与豆科植物共生固氮,将空气中分子态氮转化为植物可利用的化合态氮,为植物提供氮素营养^[2];而且近年来国内外研究发现,在低磷胁迫条件下根瘤菌可以合成不含磷的脂

类,即无磷脂来替代磷脂构成细胞膜^[3–4],这一特性增强了根瘤菌在低磷胁迫条件下生存竞争能力。据文献报道,*Sinorhizobium meliloti* 1021在低磷胁迫下可以合成硫苷脂(SL)、鸟氨酸脂(OL)、二酰基甘油三甲基高丝氨酸(DGTS)等3种无磷脂,其中DGTS是一种主要的无磷脂,其含量可达到总细胞膜脂的50%以上^[5]。推测DGTS是根瘤菌的一种重要的细胞膜无磷脂,可能在增强根瘤菌的抗逆性方面起重要作用。苜蓿(*Medicago sativa*)是一种优质牧草,堪称牧草之王,是世界范围内栽培最悠久、面积最广泛的豆科牧草。我国现有苜蓿面积约133万 hm^2 ,居世界第六位^[6]。我国对

苜蓿根瘤菌资源及其在苜蓿种植中应用已有广泛研究,但是关于苜蓿根瘤菌细胞膜无磷脂的研究还未见报道。本研究对采自我国黑龙江省的一株苜蓿根瘤菌,分别在低磷胁迫及正常磷含量条件下进行细胞膜膜脂的组成分析,明确不同条件下膜脂的组成,并进一步对其无磷脂DGTS的生物合成基因进行克隆与重组表达研究,旨在发掘我国无磷脂DGTS合成的菌种及其基因资源,为进一步的开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用一株苜蓿根瘤菌由中国农业科学院农业资源与农业区划研究所农业微生物资源与利用研究室提供,已知根瘤菌参考菌株 *Mesorhizobium huakuii* CCBAU2609^T 和 *Sinorhizobium meliloti* 1021 由中国农业大学提供(表 1)。*E. coli* BL21(DE3)和 pET-30a(+) Vector 为本实验室保存, pGEM-T Easy Vector system I 试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.2 培养基: 根瘤菌培养所用培养基为 TY 培养基^[7]和 Sherwood 基本培养基^[8], Sherwood 高磷培养基是指含 1.3 mmol/L K₂HPO₄ 的 Sherwood 基本培养基; Sherwood 低磷培养基是指含 0.02 mmol/L K₂HPO₄ 的 Sherwood 基本培养基。*E. coli* 培养采用 LB 培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器: Silica gel 60 F254 高效薄层层析板(20 cm×20 cm), 购自德国 Merk 公司; 磷脂标准品 PE、PC、PG, 购自美国 Sigma 公司;

限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Nde* I、BSA、CIP, 购自美国 NEB 公司; T4 DNA Ligase, 购自 Promega 公司; *Xba* I 和 *rTaq*, 购自 TaKaRa 公司; Plasmid Mini Kit I, 购自 OMEGA 公司; 总 DNA 提取试剂盒, 购自北京天根生化公司; DNA marker 和蛋白质 Marker, 购自北京全式金公司。实验中所用的引物, 均为上海生工生物工程技术有限公司合成, 其它常规试剂为国产或进口分析纯。实验中主要使用的仪器有: 薄层层析缸, 27.0 cm×26.5 cm×7.0 cm, 购自美国 Sigma 公司; N-EVAP 氮吹仪, 购自美国 Organomation 公司; 5417C 型台式离心机, 购自德国 Eppendorf 公司; Bio-Rad PTC-100 型 PCR 仪, 购自美国伯乐公司; 凝胶成像系统 GDS-8000, 购自美国基因公司。

1.2 根瘤菌的培养与菌体收集

将-80 °C 超低温保存的菌种, 接种 100 μL 至 5 mL TY 液体培养基中, 28 °C 振荡培养 2 d 以活化菌株。将活化好的菌液分别按 1%的接种量接种于 50 mL Sherwood 高磷和低磷培养基, 28 °C 振荡培养 3-7 d 后, 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 以每管约 40 mg 湿菌体的量, 分装于 1.5 mL 离心管中, 于-20 °C 冰箱贮存备用。

1.3 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因的 PCR 扩增及序列测定采用文献[9]的方法, 最后将所获得的 16S rRNA 基因序列通过 EzTaxon (www.eztaxon.org)进行同源性比对分析。

1.4 细胞膜脂的提取

采用 Bligh-Dyer 方法^[10]提取细胞膜脂类: 首

表 1 本研究所用根瘤菌菌株
Table 1 Rhizobia strains used in this study

菌株 Strains	宿主植物 Host plant	地理来源 Geographic origin
<i>Mesorhizobium huakuii</i> CCBAU2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	南京
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 ^[7]	<i>Medicago sativa</i>	美国
17560	苜蓿	黑龙江

先取装有 40 mg 左右湿菌体的 1.5 mL 离心管, 菌体重悬于 100 μ L 去离子水中后涡旋; 加入 125 μ L 氯仿和 250 μ L 无水甲醇涡旋至混合均匀, 14 000 r/min 离心 5 min, 破碎的细胞壁等杂质被离心下来, 将上层清液转入另一新的离心管中; 加入 125 μ L 氯仿和 125 μ L 去离子水, 振荡均匀后 14 000 r/min 离心 5 min, 转移下层有机相进入新的 1.5 mL 离心管中, 即得到溶解于氯仿的细胞膜脂, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱贮存备用。

1.5 细胞膜脂的分析

1.5.1 单向薄层层析分析^[11-13]: 将以上保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱的膜脂样品用氮吹仪吹干, 重新溶解于 30 μ L 氯仿中, 得到所需脂类的浓缩样品。磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰甘油(PG)标准品粉末分别溶解于氯仿中, 配制成 1 g/L 磷脂溶液, 每次点样使用 25 μ L。取 20 cm \times 20 cm Silica gel 60 F254 高效薄层层析铝箔板一张, 用铅笔在距离层析板下边缘 1.5 cm 处划一条直线, 每隔 1 cm 标出点样点。用移液器小心点样于硅胶板上, 使点样点尽量小。实验所用展层剂配比为氯仿:甲醇:水=140:60:10 (V/V/V), 展层时间约 80 min。

1.5.2 脂类的染色: 采用碘蒸气熏蒸方法、茚三酮法及钼蓝染色法^[11-12]对薄层层析板进行染色。

1.6 DGTS 合成基因 *btaA* 和 *btaB* 的 PCR 扩增及序列测定

据文献报道, 在 *Rhodobacter sphaeroides* 存在两个基因 *btaA* 和 *btaB*, 它们分别编码 DGTS 生物合成过程的两个酶。这两个基因位于同一个操纵子内, 而且 *btaA* 基因的终止密码与 *btaB* 基因的起始密码重叠^[14]。 *Sinorhizobium meliloti* 中的 *Y01848* 和 *Y01847* 基因被鉴定为 *btaA* 和 *btaB* 基因^[3]。从 GenBank 中下载 *btaA* 和 *btaB* 基因序列, 在 DNAMAN 上比对后, 用 Primer 5.0 设计引物序列如下:

btaA-f: 5'-GGAATACATATGACGACTTCGCCCCGGAT-3';

btaA-r: 5'-AAAAGGATCCTCATGCTTTCTTCCGCGAGAT-3';

btaB-f: 5'-GGAATACATATGAGCGCCGTGCAGACCGCGAA-3';

btaB-r: 5'-AAAAGGATCCCCTACGGTGCCGCGCGCGGATAGA-3'。

序列中加下划线部分为保护碱基, 斜黑体部分在正向引物中为 *Nde* I 酶切位点, 在反向引物中为 *Bam*H I 酶切位点。挑选一株产 DGTS 的供试菌株 17560, 以其基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 采用 25 μ L 反应体系 [基因组 DNA 模板 2 μ L, 10 \times 反应缓冲液 2.5 μ L, *btaA*-f 或 *btaB*-f (20 μ mol/L) 2 μ L, *btaB*-r 或 *btaA*-r (20 μ mol/L) 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, *rTaq* (5 U/ μ L) 2.5 U, ddH₂O 补足 25 μ L], PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。采用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物, 克隆于 pGEM-T Easy^[15] 后送 TaKaRa 测序, 用 BLASTx 在 GenBank 中搜索, 分析所得的序列。

1.7 *btaA* 和 *btaB* 基因的克隆

对回收的 PCR 扩增产物与 pET-30a(+) 质粒分别进行 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切, 酶切体系 (80 μ L) 为: DNA/pET-30a(+) 10 μ L; 10 \times *Bam*H I Buffer 8 μ L; BSA (10 g/L) 0.8 μ L; *Nde* I (20 U/ μ L) 1 μ L; ddH₂O 59.2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切作用 1 h 后加入 1 μ L *Bam*H I (20 U/ μ L), 37 $^{\circ}$ C 酶切作用 2 h。载体酶切后做去磷酸化反应以防止载体自连, 去磷酸化反应体系 (100 μ L) 为: 载体双酶切产物 80 μ L, 10 \times *Bam*H I Buffer 2 μ L, CIP (10 U/ μ L) 1 μ L, 无菌水补足 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切作用 30 min 后升温至 52 $^{\circ}$ C 继续作用 30 min, 然后加入 4 μ L 250 mmol/L EDTA, 65 $^{\circ}$ C 作用 20 min。得到产物用 DNA 柱纯化试剂盒纯化后, 最终洗脱至 20 μ L 的 DDW 中。对

双酶切产物进行胶回收, 然后加入酶切产物 3 μL , pET-30a(+) 3 μL , 0.8 μL T4 DNA Ligase (3 U/ μL), 10 μL 2 \times Buffer 和 ddH₂O 3.2 μL (20 μL 体系), 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜(10 h 以上)。连接产物转入预先制备好的 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布至含有卡那霉素 Kan (50 mg/L) 的 LB 培养基平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜(12–14 h), 在含卡那霉素(Kan)的 LB 培养基平板上随机挑取单菌落, 接入含同样浓度 Kan 的 LB 液体培养基培养过夜, 提取质粒, 用 PCR 扩增和双酶切的方法双重验证, 方法同上。克隆过程中涉及到的连接、转化、质粒提取、阳性克隆的筛选等方法参考文献[16]进行。

1.8 *btaA* 和 *btaB* 基因的重组表达

1.8.1 诱导表达: 将含有阳性重组质粒和空质粒载体 pET-30a(+) 的表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 按文献[16]培养至 *OD* 为 0.4–0.5, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养, 分别在加入 IPTG 诱导之前及 IPTG 诱导 12 h 后, 取 1 000 μL 菌液, 14 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.8.2 SDS-PAGE 检测^[17]: 取出以上保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的菌体, 用 200 μL 无菌水重悬起来, 取 40 μL 菌悬液, 加入 10 μL 5 倍蛋白上样缓冲液, 在沸水中裂解 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清用于电泳上样。蛋白 Marker 也以同样的方法煮 5 min。用 SDS-PAGE 胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 7% 的乙酸脱色后观察并照相。

1.9 *btaA* 和 *btaB* 基因的功能验证

将带有阳性重组质粒和空质粒载体 pET-30a(+) 的表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 接种于 100 mL 含有卡那霉素(50 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 *OD*=0.4 时加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 进行诱导, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续培养 6 h 后取 2 mL 菌液, 离心收集菌体, 提取脂类做薄层层析分析, 检测是否合成 DGTS。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因序列分析结果

16S rRNA 基因序列比对结果表明, 菌株 17560 与 *Sinorhizobium meliloti* 的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.8%。

2.2 低磷胁迫下苜蓿根瘤菌细胞膜膜脂组成分析

分别在低磷胁迫下及正常磷含量条件下培养苜蓿根瘤菌菌株及已知根瘤菌参比菌株, 提取菌株的细胞膜脂, 与磷脂标准品一起进行做薄层层析分析, 经碘蒸汽染色和茚三酮染色及钼蓝染色后, 与参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的膜脂图谱和磷脂混合标样图谱对比来初步确定膜脂的组成成分。结果(图 1)表明, 分离自黑龙江省的一株苜蓿根瘤菌株 17560 的细胞膜组成明显不同于参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的膜脂组成。在低磷胁迫条件该菌株除了含有无磷脂 DGTS (图 1A 的泳道 5) 外, 还含有 3 种类型的鸟氨酸脂(OLs), 由 3 条谱带组成, 上下 2 条谱带呈紫红色, 中间的那条谱带呈橙黄色(图 1B 的泳道 5), 明显不同于参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的鸟氨酸脂(OL) 的只有 1 条谱带(图 1B 的泳道 3)。在正常磷含量(简称高磷)条件下, 该菌株的膜脂是主要由磷脂 PE、PC、PG 和一种未知的氨基磷脂组成(图 1A、B 和 C 的泳道 4); 此外菌株 17560 在高磷条件下合成少量的无磷脂 OL (图 1B 的泳道 4), 类似于参比菌株 *Sinorhizobium meliloti* 1021 在高磷条件下合成的鸟氨酸脂(OL) (图 1B 的泳道 2)。

2.3 *btaA* 和 *btaB* 基因的 PCR 扩增及序列分析

选取在低磷胁迫下产无磷脂二酰基甘油三甲基高丝氨酸(DGTS) 的菌株 17560, 在 TY 培养基培养菌株后提取基因组 DNA, 采用引物对 *btaA*-f 和 *btaB*-r 进行 PCR 扩增得到一条大小约 2 kb 的

DNA 片段, 与预测条带大小基本一致, 切胶回收目的片段连接于 pGEM T-Easy 载体, 送 TaKaRa 公司测序, 获得全长 1 913 bp 的序列, 采用 DNAMAN 软件及 ORF finder 在线分析软件对插入片段进行 ORF 分析, 结果如图 2 所示, 在 plus1 中存在一个长度为 1 251 bp (碱基位置: 1-1 251) 完整的 ORF, 编码 416 个氨基酸, 命名为 ORF416; 在 Plus3 中存在另一个长度为 666 bp (碱基位置: 1 248-1 913) 完整的 ORF, 编码 221 个氨基酸, 命名为 ORF221 (它们在 GenBank 中的登录号分别为: JN977501 和 JN977502)。

将这两个 ORF 翻译所得的氨基酸序列在线进行 BLASTp 相似性比对, 结果显示: ORF416 编码的蛋白分子量大小预测为 45 557.05 Da, 属于 DUF3419 家族, 与 *Sinorhizobium meliloti* 菌株 1021 中由 *btaA* 基因编码的蛋白 SMc01848 (S-腺苷甲硫氨酸: 二酰基甘油 3-氨基-3-羧丙基转移酶) 相似性 99%; 而 ORF221 编码的蛋白分子量大小预测为 25 044.71 Da, 属于 AdoMet_MTases 家族, 与 *Sinorhizobium meliloti* 菌株 1021 中 *btaB* 基因编码的蛋白 SMc01847 (依赖 S-腺苷甲硫氨酸的 N-甲基转移酶) 相似性 99%。

2.4 ORF416 和 ORF221 基因的重组表达

将目的片段克隆到表达载体 pET-30a(+)后,

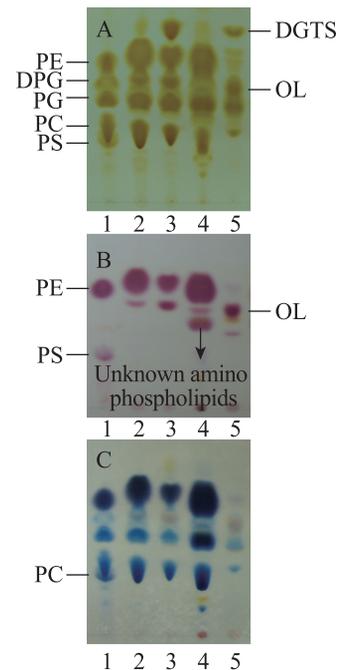


图 1 不同培养条件下供试菌株细胞膜脂薄层层析图谱

Fig. 1 Thin-layer chromatogram of membrane lipids from tested strains under different culture conditions

注: A: 碘蒸汽染色, B: 茚三酮染色, C: 钼蓝染色。1: PC, PE, PG, PS 和 CL 混合标样; 2, 3: *S. meliloti* 1021 (高磷, 低磷); 4, 5: 17560 (高磷, 低磷)。

Note: Lipids were visualized with iodine (A), ninhydrin (B) and molybdenum blue reagent (C) respectively. 1: Mixture of PC, PE, PG, PS and CL; 2, 3: *S. meliloti* 1021 (Under high or low concentrations of inorganic phosphate, respectively); 4, 5: 17560 (Under high or low concentrations of inorganic phosphate, respectively).

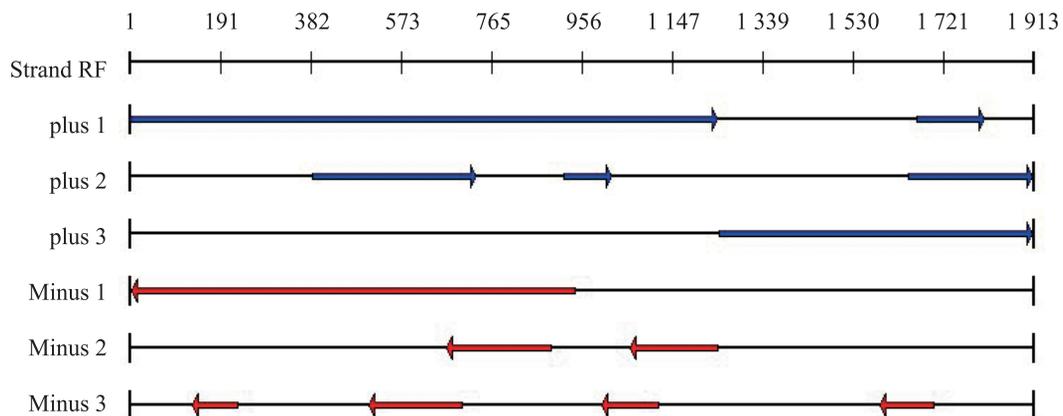


图 2 插入片段的 ORF 分析结果

Fig. 2 The ORFs of the insert fragment

提取质粒, 采用酶切和 PCR 两种方法证明所获得的重组质粒为带有 ORF416 和 ORF221 基因的 pET-30a(+) 载体的阳性重组质粒, 将其命名为 pLH01。转入阳性重组质粒 pLH01 和空质粒载体 pET-30a(+) 的表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 分别命名为 *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 和 *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+). 表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 和阴性对照菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+) 在 LB 液体培养基中培养, 经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 37 °C、150 r/min 振荡培养 12 h 后收集菌体, 以 IPTG 诱导前菌体作对照, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果见图 3。

使用 ExPASy 对 ORF416 和 ORF221 所编码蛋白质的等电点和分子量做预测, 结果显示, ORF416 所编码的蛋白质 pI 为 9.07, 分子量大小为 45 557.05 Da。ORF221 所编码蛋白质 pI 为 9.88,

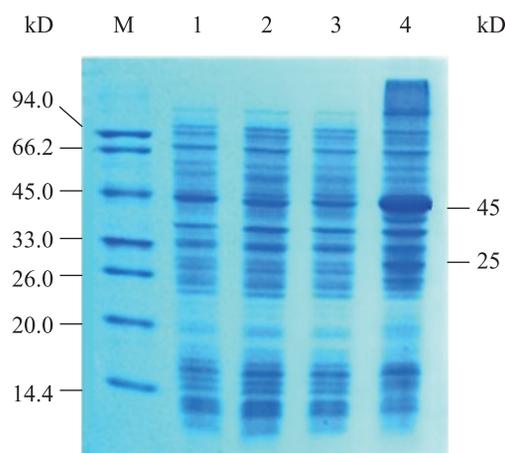


图 3 *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 的诱导表达

Fig. 3 The SDS-PAGE analysis of *btaA* and *btaB* protein expressed in *E. coli* BL21(DE3)

注: M: Middle range 蛋白分子量标准; 1: *E. coli* BL21(DE3)-pET30a 诱导前; 2: *E. coli* BL21(DE3)-pET30a 诱导后; 3: *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 诱导前; 4: *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 诱导后。

Note: M: Middle range protein molecular weight standards; 1: Before induction of *E. coli* BL21(DE3)-pET30a; 2: After induction of *E. coli* BL21(DE3)-pET30a; 3: Before induction of *E. coli* BL21(DE3)-pLH01; 4: After induction of *E. coli* BL21(DE3)-pLH01.

分子量大小为 25 044.71 Da。由图 3 可以看出, 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 检测发现, *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 中出现两种过量表达蛋白, 其分子量大小分别约为 45 kD 和 25 kD, 与预测的 *btaA* 和 *btaB* 同源基因表达产物的分子量大小相符; 而 *E. coli* BL21(DE3)-pET30a 则在相应位置没有出现过量表达蛋白条带。

2.5 ORF416 和 ORF221 基因的功能验证

表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 和阴性对照菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+) 在 LB 培养基中培养, 经终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 在 30 °C 条件下继续培养 6 h 后, 提取细胞膜脂类做薄层层析分析, 结果如图 4 所示, *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 经 IPTG 诱导 6 h 后膜脂中检测到有 DGTS 合成, 而 *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+)

1 2 3 4 5 6 7 8 9

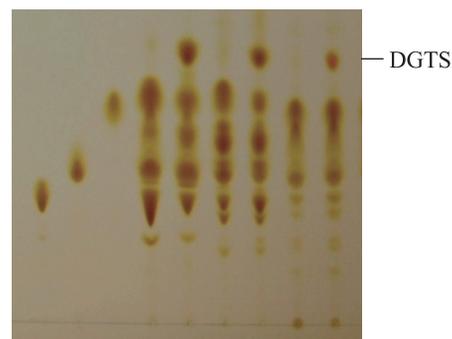


图 4 *btaA* 和 *btaB* 基因在 *E. coli* BL21(DE3) 体内诱导表达蛋白活性检测

Fig. 4 Detection of protein activity for *btaA* and *btaB* genes expressed in *E. coli* BL21(DE3) after induction

注: 1: PC 标样(1 g/L); 2: PG 标样(1 g/L); 3: PE 标样(1 g/L); 4: *S. meliloti* 1021 高磷; 5: *S. meliloti* 1021 低磷; 6: CCBAU2609 高磷; 7: CCBAU2609 低磷; 8: *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+) 诱导后; 9: *E. coli* BL21(DE3)-pLH01 诱导后。

Note: 1: Standard sample of PC (1 g/L); 2: Standard sample of PG (1 g/L); 3: Standard sample of PCE (1 g/L); 4: *S. meliloti* 1021 under high phosphate condition; 5: *S. meliloti* 1021 under low phosphate condition; 6: CCBAU2609 under high phosphate condition; 7: CCBAU2609 under low phosphate condition; 8: Before induction of *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+); 9: After induction of *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+).

则没有检测到 DGTS, 说明本研究所克隆的 *btaA* 和 *btaB* 的同源基因的表达产物具有 DGTS 合成相关酶活性。

3 讨论

鸟氨酸脂广泛存在于革兰氏阴性细菌中, 在 *Mycobacterium* 和 *Streptomyces* 等少数革兰氏阳性细菌中也有报道, 但似乎在古细菌及真核生物中未见报道^[4,18]。已有报道在 *Thiobacillus thiooxidans* 等抗酸细菌的细胞膜外层膜中富含鸟氨酸脂, 因此有人推测氨酸脂可能具有抗酸作用^[19]。*Rhizobium tropici* 是从墨西哥热带菜豆根瘤中分离确定的一个种, 该种的模式菌株 CIAT899 对高温或者酸性环境等多种环境胁迫具有很好的抗性, 可以在 pH 4.0 的酸性培养基上生长, 酸性条件下的结瘤竞争能力很强^[20]。2005 年, Rojas-Jimenez 等^[21]报道了模式菌株 CIAT899 中存在 4 种结构不同的鸟氨酸脂, 分别命名为 S1、S2 和 P1、P2, 并证明其中 S1、S2 是菌株 CIAT899 耐酸性所必需, P1、P2 决定了菌株与宿主植物菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 的共生有效性。早先也有研究报道在 *Burkholderia cepacia* 中当温度升高时, 羟基化的鸟氨酸脂含量升高^[22]。2011 年, Vences-Guzman 等^[23]对修饰的(羟基化)鸟氨酸脂的生物合成及其在 *R. tropici* 抗逆性中的作用进行了深入细致的研究, 结果也表明在酸性逆境中, *R. tropici* 的鸟氨酸脂的生物合成增加, 其细胞膜外层膜中富含鸟氨酸脂。这些研究结果一致表明, 被修饰的鸟氨酸脂在抵御逆境中起作用。本研究中一株分离自黑龙江省的苜蓿根瘤菌株在低磷胁迫条件培养下都合成 3 种类型的鸟氨酸脂, 对应于 *Rhizobium tropici* 模式菌株 CIAT899 的鸟氨酸脂 S1、S2 及 P1, 推测这些菌株中所含有羟基化的鸟氨酸脂可能也赋予它们对多种逆境抵御能力, 不过这种推测还有待于进一步实验证实。

二酰基甘油三甲基高丝氨酸(DGTS)广泛存在于绿藻、苔藓植物和蕨类植物低等绿色植物、真菌和变形虫中^[24]。在原核生物中 DGTS 被鉴定为一种细胞膜无磷脂, 在低磷胁迫条件下它可以取代 PC 构成细胞膜^[5,25]。1999 年, Geiger 等首次报道了 DGTS 是 *Sinorhizobium meliloti* 在低磷胁迫条件下, 从头新合成的主要细胞膜脂, 其含量占总细胞膜脂的 57%。已有实验证明 DGTS 等无磷脂可促进 *Sinorhizobium meliloti* 在低磷胁迫条件下的生长^[3]。本研究中菌株 17560 合成无磷脂 DGTS, 说明该苜蓿根瘤菌株可能在低磷胁迫条件下都具有较好的生存竞争能力, 具有较好的应用潜力。

目前国内对外对根瘤菌细胞膜脂的研究并不多, 据文献报道, *Sinorhizobium meliloti* 1021 在低磷胁迫下可以合成硫苷脂(SL)、鸟氨酸脂(OL)、二酰基甘油三甲基高丝氨酸(DGTS)等 3 种无磷脂^[5]。而本研究发现分离自黑龙江省的一株苜蓿根瘤菌 17560 虽然与 *Sinorhizobium meliloti* 的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.8%, 但其细胞膜脂组成明显不同于 *Sinorhizobium meliloti* 1021 的膜脂组成, 首次报道在 *Sinorhizobium* 膜脂中发现了一种未知的氨基磷脂及 3 种不同类型的鸟氨酸脂(OLs), 揭示了根瘤菌细胞膜组成的多样性。此外, 菌株 17560 的细胞膜组成随培养基中的磷含量不同而变化, 在正常磷含量条件下, 该菌株的膜脂是由磷脂 PE、PG、PC 及一种未知的氨基磷脂等组成; 在低磷胁迫条件培养下, 该菌株的膜脂中无磷脂含量明显升高, 而磷脂含量有所降低, 膜脂主要由 3 种不同类型的鸟氨酸脂(OLs)和 DGTS 等无磷脂组成。本研究从所获得 DGTS 产生菌 17560 中成功扩增得到 *btaA* 和 *btaB* 基因, 克隆至表达载体 pET-30a(+)并在表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)中诱导表达成功, 并证实目的基因的表达产物具有酶活性。DGTS 合成基因的成功克隆与表达, 为进一步开发利用奠定了一定工作基础。

参 考 文 献

- [1] 沈善敏, 殷秀岩, 张璐. 农业系统中磷肥残效及磷循环研究 I. 作物吸磷量、磷肥残效及土壤有机磷变化[J]. 应用生态学报, 1992, 3(2): 138-143.
- [2] Zahran HH. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(4): 968-989.
- [3] López-Lara IM, Gao JL, Soto MJ, et al. Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with *Alfalfa* but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth[J]. Molecular Plant-Microbe Interact, 2005, 18(9): 973-982.
- [4] Geiger O, González-Silva N, López-Lara IM, et al. Amino acid-containing membrane lipids in bacteria[J]. Progress in Lipid Research, 2010, 49(1): 46-60.
- [5] Geiger O, Rohrs V, Weissenmayer B, et al. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*[J]. Molecular Microbiology, 1999, 32(1): 63-73.
- [6] 张玉发. 试论苜蓿生产在我国农业三元种植结构调整中的地位和作用[J]. 草业科学, 1999, 16(2): 11-13.
- [7] Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*[J]. Journal of General Microbiology, 1974, 84(1): 188-198.
- [8] Sherwood MT. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1970, 33(4): 708-713.
- [9] 黄翠丽, 王敏, 成晓杰, 等. 一株产共轭亚油酸瘤胃细菌 *Streptococcus infantarius* RB111 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 78-84.
- [10] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Biochemistry and Cell Biology, 1959, 37(8): 911-917.
- [11] Choma A, Komaniecka I. Analysis of phospholipids and ornithine-containing lipids from *Mesorhizobium* spp.[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2002, 25(3): 326-331.
- [12] Weissenmayer B, Gao JL, López-Lara IM, et al. Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(3): 721-733.
- [13] 孙秀燕, 宋爱菊, 张治国. 单向薄层色谱技术分离磷脂的方法研究[J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(4): 262-265.
- [14] Klug RM, Benning C. Two enzymes of diacylglycerol-*O*-4'-(*N,N,N*-trimethyl) homoserine biosynthesis are encoded by *btaA* and *btaB* in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2001, 98(10): 5910-5915.
- [15] 曾艳, 陈强, 王敏, 等. 一株高抗汞细菌的分离鉴定及其抗性基因的克隆与表达[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1628-1633.
- [16] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 27-30.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-108.
- [18] López-Lara IM, Sohlenkamp C, Geiger O. Membrane lipids in plant-associated bacteria: their biosyntheses and possible functions[J]. Molecular Plant-Microbe Interact, 2003, 16(7): 567-579.
- [19] Dees C, Shively JM. Localization of quantitation of the ornithine lipid of *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 149(2): 798-799.
- [20] Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, 41(3): 417-426.
- [21] Rojas-Jiménez K, Sohlenkamp C, Geiger O, et al. A ClC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(11): 1175-1185.
- [22] Taylor CJ, Anderson AJ, Wilkinson SG. Phenotypic variation of lipid composition in *Burkholderia cepacia*: a response to increased growth temperature is a greater content of 2-hydroxy acids in phosphatidylethanolamine and ornithine amide lipid[J]. Microbiology, 1998, 144(7): 1737-1745.
- [23] Miguel ÁVG, Guan ZQ, Ernesto OO, et al. Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899[J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(6): 1496-1514.
- [24] Sohlenkamp C, López-Lara IM, Geiger O. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria[J]. Progress in Lipid Research, 2003, 42(2): 115-162.
- [25] Benning C, Huang ZH, Gage DA. Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 317(1): 103-111.