

研究报告

固氮施氏假单胞菌 A1501 四碳二羧酸结合蛋白
DctP 的功能及表达特性戴淑玲^{1,2} 李红权³ 尚立国² 杨智敏² 闫宁^{1,2} 陆伟² 燕永亮² 战崙华^{2*}

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院 四川 绵阳 621010)

(2. 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

(3. 河北大学 河北 保定 071002)

摘要:【目的】研究施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) A1501 四碳二羧酸结合蛋白 DctP 的生物学功能和自身表达特性。【方法】构建结合蛋白编码基因 *dctP* 的非极性突变株, 测定 *dctP* 突变株以不同四碳二羧酸(琥珀酸、延胡索酸、苹果酸)为唯一碳源时的生长情况和固氮酶活性; 构建 *dctP* 基因启动子的融合表达载体 *dctP-lacZ*, 将其分别转入野生型 A1501 和 *ntrBC*、*rpoN* 和 *dctB* 突变株中, 测定在不同四碳二羧酸为唯一碳源诱导条件下重组菌株中的 β -半乳糖苷酶活性。【结果】*dctP* 基因的突变使菌株丧失了四碳二羧酸的利用能力, 影响了菌株的固氮酶活性; 苹果酸、延胡索酸、琥珀酸对 *dctP-lacZ* 具有明显的诱导作用; 在 *rpoN*、*ntrBC* 和 *dctB* 突变株中, *dctP* 的表达量均显著降低。【结论】DctP 蛋白在四碳二羧酸的利用过程中起重要的作用, *dctP* 基因的表达是 *RpoN* 依赖型, 可被四碳二羧酸诱导, 受到调控蛋白 *NtrBC*/*DctB* 的协同调控。

关键词: 施氏假单胞菌 A1501, 四碳二羧酸, DctP

Characterization and expression of C4-dicarboxylate binding protein
coding gene *dctP* of the nitrogen fixing bacterium
Pseudomonas stutzeri A1501DAI Shu-Ling^{1,2} LI Hong-Quan³ SHANG Li-Guo² YANG Zhi-Min² YAN Ning^{1,2}LU Wei² YAN Yong-Liang² ZHAN Yu-Hua^{2*}

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China)

(2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(3. Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: [Objective] Current study was designed to determine the functional characterization and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31400076)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-82109861; E-mail: zhanyuhua@caas.cn

Received: November 17, 2016; **Accepted:** January 20, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 08, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31400076)

***通讯作者:** Tel: 86-10-82109861; E-mail: zhanyuhua@caas.cn

收稿日期: 2016-11-17; 接受日期: 2017-01-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-08

expression pattern of C4-dicarboxylate binding protein coding gene *dctP* in nitrogen fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. **[Methods]** We constructed the nonpolar *dctP* mutant. The nitrogenase activity and growth curve between the wild type and mutants were assayed in minimal medium supplemented with different C4-dicarboxylates (succinate, malate or fumarate) as a sole carbon source were measured. The *dctP-lacZ* fusion vector was constructed and transformed to wild type A1501, *dctB* mutant, *rpoN* mutant and *ntrBC* mutant, respectively. The β -galactosidase activity was detected to analyze the expression of *dctP* gene in recombinant strains grown with different C4-dicarboxylates as a sole carbon source. **[Results]** It was found that *dctP* mutant lost the ability to utilise C4-dicarboxylates and its nitrogenase activity was much lower than the wild type. The analysis of β -galactosidase activity indicated that the succinate, malate or fumarate induced expression of the *dctP* gene. In comparison with wild type, the expression level of *dctP* gene was significantly decreased in the deletion mutants for *dctB*, *rpoN* or *ntrBC*. **[Conclusion]** The DctP protein played an important role in the C4-dicarboxylate utilization of *P. stutzeri* A1501. C4-dicarboxylates (succinate, malate or fumarate) induced the expression of *dctP* gene. The DctP transcription was RpoN-dependent and under the control of DctB and NtrBC.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri* A1501, C4-dicarboxylates, DctP

四碳二羧酸包括琥珀酸、延胡索酸、苹果酸等，是固氮菌根际生长首选的碳源和能源物质，也是联合固氮菌强烈的趋化剂，它能促使固氮菌在植物根际集群^[1-2]。四碳二羧酸由四碳二羧酸转运系统(Dicarboxylic acid transport system, Dct 系统)负责运输^[3]。目前对于细菌中四碳二羧酸转运系统的分类和功能已经有所报道，细菌的四碳二羧酸载体依据蛋白序列的相似性分为以下五类：四碳二羧酸转运蛋白 DctA，由膜外向膜内转运四碳二羧酸的载体 DcuAB、DcuC、CitT 及不依赖 ATP 的三组分周质转运载体蛋白 TRAP。其中 TRAP 转运系统由聚集在一起的 3 个基因编码，*dctP* 基因编码四碳二羧酸结合蛋白，*dctQ* 和 *dctM* 编码四碳二羧酸转运体^[4]。根瘤菌中的 Dct 系统由 3 个基因聚集在一起，*dctA* 基因编码四碳二羧酸转运蛋白，*dctB* 和 *dctD* 基因编码双组分调节系统，用来响应四碳二羧酸信号和调控 *dctA* 的表达^[5-7]。在大肠杆菌中，四碳二羧酸在有氧条件下主要的转运者是 DctA，在无氧条件下由 DcuA、DcuB、DcuC 和 CitT 运输^[8-11]。虽然不同细菌中四碳二羧酸转运载体类型有所差异，但是四碳二羧酸的转运系统均由调节蛋白和转移酶系两部分组成。

施氏假单胞菌 A1501 (*Pseudomonas stutzeri* A1501)是一株分离自我国南方水稻根际土壤的联

合固氮菌，具有利用根际分泌物中的四碳二羧酸进行高效固氮的特性^[12]。本实验室已有研究表明，在 A1501 菌中存在两组编码 Dct 系统的基因，一组是由连续排列在基因组上的 *dctB*、*dctD*、*dctP*、*dctQ*、*dctM* 组成的，另一组则无规律地分散在基因组中^[13]；另外，在 A1501 菌中，*dctB* 基因编码 Dct 系统中的调节蛋白 DctB，其在联合固氮菌四碳二羧酸的运输和利用中发挥着重要的作用，进而影响菌株的固氮效率^[14]，但对于 A1501 菌中转运酶系 DctPQM 编码基因的具体功能及表达特性并没有做出深入研究。本研究以结合蛋白 DctP 为研究对象，通过突变株的构建和生理生化表型的测定，对 *dctP* 基因在四碳二羧酸转运中的作用和自身表达特性进行了研究，旨在进一步阐明联合固氮菌的四碳二羧酸转运系统，为其调控体系的深入研究奠定理论基础，也为进一步提高菌株的固氮活性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：本实验所用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 引物：实验所用 PCR 引物由上海生工公司合成，见表 2。

1.1.3 培养基和抗生素：A1501 菌及其突变株于 A15 培养基^[15]30 °C 培养，大肠杆菌 *E. coli* 于 LB

表 1 菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids		
菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性 Relevant characteristics	来源 Source
<i>P. stutzeri</i> A1501	野生型	本实验室保存
<i>E. coli</i> DH5α	大肠杆菌	本实验室保存
$\Delta ntrBC$	<i>P. stutzeri</i> A1501 <i>ntrBC</i> 突变株, Km ^r	本实验室保存
$\Delta dctB$	<i>P. stutzeri</i> A1501 <i>dctB</i> 突变株, Km ^r	本实验室保存
$\Delta dctP$	<i>P. stutzeri</i> A1501 <i>dctP</i> 非极性突变株, Km ^r	本研究构建
$\Delta rpoN$	<i>P. stutzeri</i> A1501 <i>rpoN</i> 突变株, Km ^r	本实验室保存
<i>C. ΔdctP</i>	<i>P. stutzeri</i> A1501 <i>dctP</i> 非极性突变株的回补菌株, Tc ^r , Km ^r	本研究构建
<i>ntrBC</i> (<i>dctP-lacZ</i>)	携带 <i>dctP-lacZ</i> 质粒的 <i>ntrBC</i> 突变株, Tc ^r , Km ^r	本研究构建
A1501 (<i>dctP-lacZ</i>)	携带 <i>dctP-lacZ</i> 质粒的 A1501, Tc ^r , Km ^r	本研究构建
<i>dctB</i> (<i>dctP-lacZ</i>)	携带 <i>dctP-lacZ</i> 质粒的 <i>dctB</i> 突变株, Tc ^r , Km ^r	本研究构建
<i>rpoN</i> (<i>dctP-lacZ</i>)	携带 <i>dctP-lacZ</i> 质粒的 <i>rpoN</i> 突变株, Tc ^r , Km ^r	本研究构建
pUC4KIXX	携带卡那霉素的抗性盒, Km ^r	本实验室保存
pGEM-T Easy	克隆载体, Amp ^r	Promega 公司
pRK2013	三亲结合助质粒, Km ^r	本实验室保存
pK18mob	自杀性质粒, Km ^r	本实验室保存
pK18mobF	构建 <i>dctP</i> 非极性突变株所用到的重组质粒, Tc ^r	本研究构建
pGD926	<i>lacZ</i> 融合广宿主载体, Tc ^r	本实验室保存
<i>dctP-lacZ</i>	含 <i>dctP</i> 基因启动子的 <i>lacZ</i> 融合表达载体, Tc ^r	本研究构建

表 2 PCR 扩增所用的引物 Table 2 Primers for PCR amplification		
引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	用途 Usage
Pp-F	GCGGGATCC AGCATCGCTGGTCTGCCCCACGC	扩增 <i>dctP</i> 基因
Pp-R	GCGAAGCTT CTTGCTGGAAGCGGTCGACC	
YP-F	GCCGATTCATTAATGCAGCGGGCAC	验证 $\Delta dctP$
YP-R	CATGAACGCCCTCTGGCGGC	
P-F	CTCAAGCTTCGTAAGACACTGCATGACAA	扩增 <i>dctP</i> 基因启动子 DNA 片段
P-R	CCTGGATCCATTGATGTTTCCTCTTGTGTG	
C-F	CGGGATCCTGGCATTGCAGGGAGG	扩增包含完整 <i>dctP</i> 基因及其启动子的 DNA 片段
C-R	CCAAGCTTACCAGGCTAACTAA	

培养基(g/L, 胰化蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0) 37 °C 培养。测定菌体的固氮酶活性时采用不添加(NH₄)₂SO₄的 A15 培养基。琥珀酸、苹果酸、延胡索酸、葡萄糖的终浓度为 50 mmol/L。抗生素在培养基中的浓度: 卡那霉素(Km) 50 mg/L,

氨苄青霉素(Amp) 100 mg/L, 四环素(Tc) 12 mg/L。
1.1.4 主要试剂和仪器: 工具酶购于 NEB 公司和 TaKaRa 公司; 质粒提取、DNA 提取及胶回收试剂盒购于 Magen 公司; 其它化学试剂购于北京化学试剂公司。PCR 仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 三亲结合: 活化供体菌(含重组质粒的大肠杆菌)、受体菌(野生型或突变株)和含有穿梭质粒 pRK2013 的大肠杆菌, 转接至含有相应抗生素的 LB 培养基中, 供体菌和含有穿梭质粒 pRK2013 的大肠杆菌 37 °C、220 r/min 振荡培养过夜, 受体菌 30 °C、220 r/min 振荡培养过夜。将上述菌分别以 2% 的接种量转至新鲜的 LB 培养基中, 温度不变, 200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6–1.0, 分别收集 1 mL 供体菌、受体菌和含有穿梭质粒 pRK2013 的大肠杆菌, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min。用 0.85% 的 NaCl 洗涤菌体 2 次, 将 3 种菌混合在一起离心, 用 100 μ L 0.85% 的 NaCl 溶液重悬菌体沉淀。

将重悬菌每次取 10 μ L 滴加到无抗性的 LB 平板上, 后续菌液滴加至先前风干后的菌液上方, 如此重复直至滴加完毕。30 °C 正置培养 48 h。将菌苔刮下, 用 0.85% 的 NaCl 溶液倍比稀释, 各取 100 μ L 涂于加相应抗生素的 A15 培养基平板上, 30 °C 培养至可以挑取单菌落。

1.2.2 *dctP* 非极性突变株的构建: *dctP* 基因 DNA 片段的 PCR 扩增: 以 A1501 总 DNA 为模板, Pp-F 和 Pp-R 为引物, 经 PCR 扩增获得突变基因 *dctP* 的 DNA 片段(目的片段大小为 350 bp)。PCR 反应体系: 模板 DNA (200 ng/ μ L) 1 μ L, Pp-F 和 Pp-R (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 18.0 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增获得的突变基因 *dctP* 的 DNA 片段克隆到自杀质粒 pK18mob 上, 通过三亲接合导入野生型菌株, 进行同源单交换, 经卡那霉素抗性筛选和 PCR 验证(以 YP-F 和 YP-R 为引物, 目的片段大小为 827 bp)获得 *dctP* 非极性突变株。PCR 扩增验证反应条件为: 95 °C 10 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.3 生长曲线的测定: 挑取待测菌株接种于含对应抗生素的 LB 液体培养基中, 30 °C、220 r/min 振

荡培养过夜。4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 收集培养过夜的菌株, 经 0.85% 的 NaCl 溶液洗涤菌体 2 次, 转接至以不同四碳二羧酸为唯一碳源的 A15 培养基中, 初始 OD_{600} 为 0.1, 30 °C、200 r/min 振荡培养, 每隔 2 h 取样测定菌株的 OD_{600} 。以时间(h)为横坐标轴, OD_{600} 为纵坐标轴绘制生长曲线。

1.2.4 固氮酶活的测定: 采用乙炔还原法测定菌株的固氮酶活性。具体方法如下: 用 0.85% 的 NaCl 溶液洗涤培养过夜的菌体 2 次, 转接至装有 A15 无氮培养基的三角瓶中, 初始 OD_{600} 为 0.1, 体积为 10 mL。盖上胶塞, 密封瓶口, 充氩气 4 min 用以排出三角瓶中的空气。向瓶中注入 0.5% 的氧气和 10% 的乙炔。每个菌株做 5 个重复, 30 °C、220 r/min 振荡培养。每隔 2 h 用微量进样器从瓶中抽取 250 μ L 气体注入气相色谱中(SP-2305 型气相色谱仪)检测乙烯含量, 记录乙烯峰面积。利用公式计算固氮酶的活性: 固氮酶活性[nmol C₂H₄/(mg protein·h)]=所测菌株乙烯峰面积 \times (三角瓶中气相体积/进样量)/1 nmol 标准乙烯峰的面积 \times 菌体蛋白浓度 \times 反应时间。

1.2.5 *dctP-lacZ* 重组质粒的构建: 以 A1501 总 DNA 为模板, P-F 和 P-R 为引物, 通过 PCR 方法获得大小为 430 bp 的含 *dctP* 基因启动子区的 DNA 片段, PCR 产物经切胶回收后, 与克隆载体 pGEM-T Easy 连接, 转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中, 蓝白斑筛选并将阳性克隆质粒测序。提取测序正确的阳性克隆质粒, 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切, 切胶回收的 DNA 片段, 将其与经 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切的 pGD926 载体连接, 连接产物转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 中, PCR 筛选出阳性克隆并测序验证。经测序正确的 *dctP-lacZ* 融合表达载体通过三亲结合的方法, 分别转入野生型菌株 A1501、*ntrBC* 突变株、*rpoN* 突变株和 *dctB* 突变株中, 获得重组菌 A1501 (*dctP-lacZ*)、*ntrBC* (*dctP-lacZ*)、*rpoN* (*dctP-lacZ*)和 *dctB* (*dctP-lacZ*)。

1.2.6 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)活性的测定: 采用 ONPG 法测定, 具体操作步骤如下: 将待测菌

株于 LB 培养基中 30 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6, 记录 OD_{600} 值。取 1 mL 菌液 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清并用无菌水洗涤 2 次后按需要悬浮菌体。菌悬浮液与 Buffer Z 混合, 使总体积为 1 mL, 加入 2–3 滴氯仿, 混匀, 37 °C 保温 40 min。30 °C 保温 5 min, 加入 200 μ L (4.0 g/L) 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG), 混匀, 30 °C 继续保温, 开始记录反应起始时间。待样品出现黄色, 加入 500 μ L 1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液用以终止反应, 记录反应终止时间, 样品放冰上待测。用紫外分光光度计测定 OD_{420} 和 OD_{550} 值。按以下公式计算 β -半乳糖苷酶的活性: $Units = 1\ 000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / T \times V \times OD_{600}$ (T : 反应时间, V : 反应中菌体体积)。

2 结果与分析

2.1 *dctP* 基因生物信息学分析

在 NCBI 数据库中首先对 A1501 菌中 *dctP* 基因进行核苷酸比对, 分析发现其与铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa* PAO1) 和棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* CA) 中的 *dctP* 基因序列之间的相似性较高, 相似性分别为 93% 和 86%, 而且 A1501 菌中的 Dct 系统与 *P. aeruginosa* PAO1 和 *A. vinelandii* CA 中的编码基因序列之间的相似性较高(图 1)。然后进一步对 *dctP* 基因的启动子区域进行分析, 发现了 RpoN 的保守结合位点(GG-N₁₀-GC, 如图 1 中黑色

框部分所示), 因此推测 *dctP* 基因的表达可能受到 RpoN 蛋白的调控。

2.2 *dctP* 非极性突变株及其功能回补株的构建

为了研究 *dctP* 基因在野生型 A1501 中的功能, 根据同源重组的原理构建了 *dctP* 基因的非极性突变株。以 A1501 总 DNA 为模板, 以 Pp-F 和 Pp-R 为引物进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳验证, 获得大小为 350 bp 的 *dctPp* (*dctP* 的部分序列) 序列, 见图 2 (图 2A 第 2 泳道)。PCR 产物切胶回收, 将 PCR 产物和质粒 pK18mob 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 然后进行连接和转化。提取所得转化子质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切验证, 获得重组质粒 pK18mobF 如图 2 (图 2B 第 2 泳道) 所示。通过三亲结合, 将 pK18mobF 转化至野生型 A1501 中, 通过 Km^r 筛选得到三亲接合子。以三亲接合子的 DNA 为模板, 野生型基因组为对照, YP-F 和 YP-R 为引物进行 PCR 验证见图 2 (图 2C 第 1、2 和 3 泳道)。将扩增片段回收, 经测序后分析发现扩增片段的核苷酸序列与预期扩增的 DNA 片段序列有 100% 的一致性, 证明三亲接合得到的接合子为正确的 *dctP* 非极性突变株, 将其命名为 Δ *dctP*。此外构建了 Δ *dctP* 的功能回补株, 通过 PCR 扩增验证回补株(以 C-F 和 C-R 为引物), 可以得到大小为 1.3 kb 的包含完整 *dctP* 基因及启动子序列的 DNA 片段, 见图 2 (图 2D 第 1 泳道), 将回补株命名为 C. Δ *dctP*。

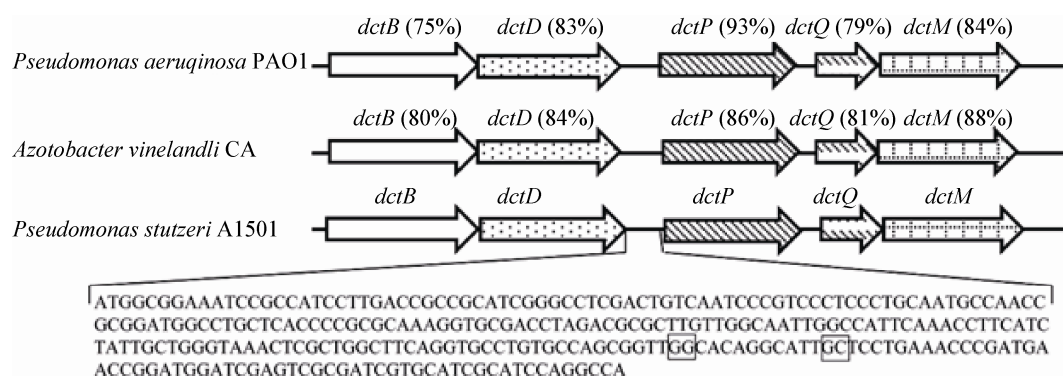


图 1 施氏假单胞菌 A1501 中 Dct 系统的基因排布和同源比对

Figure 1 Genomic organization of A1501 Dct system and comparison with equivalent clusters from different bacteria

注: RpoN 的结合位点如黑色框所示。

Note: The conserved binding sites of RpoN are boxed in black.

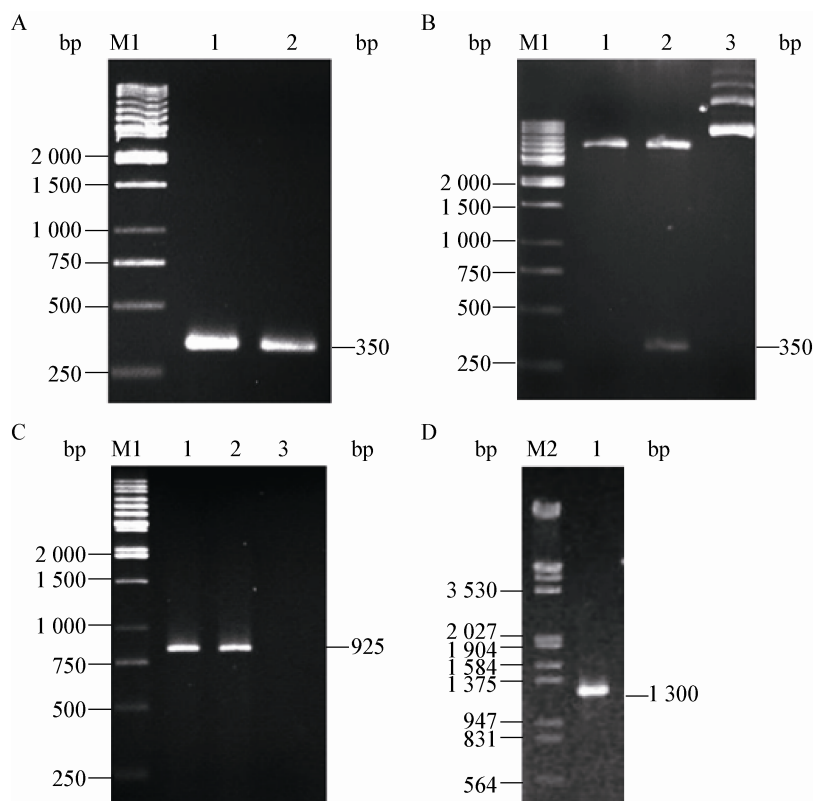


图2 *dctP* 非极性突变株和功能回补株的构建

Figure 2 Construction of nonpolar *dctP* mutant strain and function complementary strain

注：A：M1：GeneRuler™ 1 kb DNA ladder；1、2：*dctP* 片段。B：M1：GeneRuler™ 1 kb DNA ladder；1：pK18mob 的酶切验证；2：重组质粒 pK18mobF 的酶切验证；3：重组质粒 pK18mobF。C：M1：GeneRuler™ 1 kb DNA ladder；1、2：*dctP* 非极性突变体的 PCR 验证；3：阴性对照。D：M2：λDNA/*EcoRI*+*HindIII* marker；1：功能回补株 *C. ΔdctP* 的 PCR 验证。

Note: A: M1: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; 1, 2: *dctP*-fragment PCR product. B: M1: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; 1: Digestion of pK18mob; 2: Digestion of pK18mobF; 3: Plasmids of pK18mobF. C: M1: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; 1, 2: Identification of the nonpolar mutant *ΔdctP* by PCR; 3: Negative control. D: M2: λDNA/*EcoRI*+*HindIII* marker; 1: Identification of the function complementary strain by PCR.

2.3 *dctP* 突变对 A1501 菌四碳二羧酸利用的影响

为了探究 *dctP* 基因是否在四碳二羧酸代谢中发挥作用，将野生型 A1501、*dctP* 突变株 *ΔdctP* 和回补株 *C. ΔdctP* 于琥珀酸、延胡索酸或苹果酸为唯一碳源的 A15 培养基中分别培养，测定菌株生长情况，结果如图 3 所示：野生型 A1501 和 *C. ΔdctP* 在琥珀酸、延胡索酸或苹果酸为唯一碳源时生长良好，而 *dctP* 突变株无法正常生长，这说明 DctP 蛋白在 A1501 菌的四碳二羧酸利用中发挥着重要的作用，是四碳二羧酸代谢系统所必需的(图 3)。

2.4 *dctP* 突变对 A1501 菌固氮能力的影响

四碳二羧酸是细菌重要的能源底物，而能量供应是影响固氮微生物固氮能力的重要因素之一。为

了验证 DctP 蛋白是否在 A1501 菌株的氮代谢调控中发挥着作用，在测定了 *ΔdctP* 对四碳二羧酸利用情况的基础上，利用乙炔还原法比较了野生型 A1501、*ΔdctP* 以及 *C. ΔdctP* 在以苹果酸、琥珀酸、延胡索酸为唯一碳源时的固氮酶活性，结果发现：与野生型 A1501 相比，*dctP* 突变株在以苹果酸、琥珀酸或延胡索酸为唯一碳源时的固氮酶活性均出现了显著的降低，分别为野生型酶活的 1.69%、1.32%、1.08%，而互补菌株恢复了菌株的固氮酶活性(表 3)，说明 *dctP* 基因的突变影响了菌株的固氮能力，推测 DctP 蛋白可能通过参与菌株的四碳二羧酸转运影响能量供应，进而影响 A1501 菌的固氮能力。

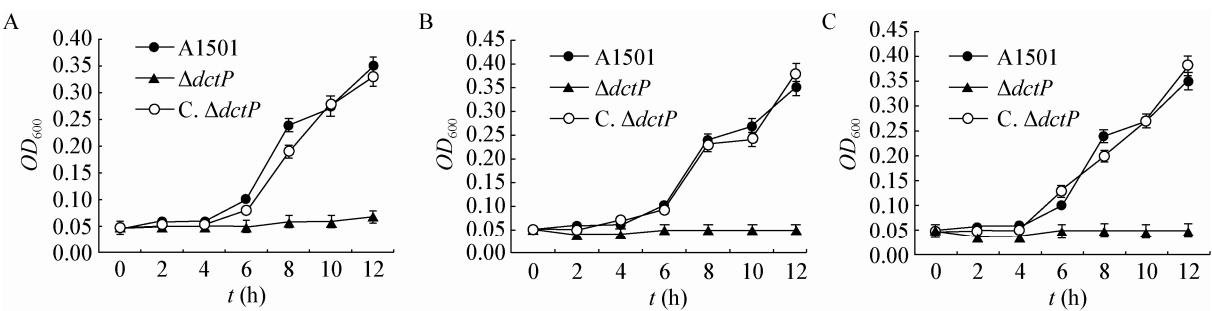


图 3 野生型 A1501、*dctP* 突变株和功能回补株 *C. ΔdctP* 在琥珀酸(A)、苹果酸(B)、延胡索酸(C)为唯一碳源时的生长曲线

Figure 3 Growth properties of wild type A1501, *dctP* mutant strain and function complementary strain *C. ΔdctP* in medium supplemented with succinate (A), malate (B) or fumarate (C) as the sole carbon source

表 3 野生型 A1501、 $\Delta dctP$ 和 *C. ΔdctP* 在不同碳源诱导条件下的固氮酶活性
Table 3 Nitrogenase activities of the wild type A1501, $\Delta dctP$ and *C. ΔdctP* grown with different carbon sources (nmol C_2H_4 /(mg protein·h), $\bar{x} \pm s$)

菌株 Strains	苹果酸 Malate	琥珀酸 Succinate	延胡索酸 Fumarate
A1501	390.70±12.70	509.80±16.00	460.60±23.00
$\Delta dctP$	4.03±0.30	4.47±0.80	2.70±0.40
<i>C. ΔdctP</i>	389.30±10.00	510.60±15.40	456.00±18.20

2.5 *dctP* 基因的启动子分析及表达特性

为了研究 *dctP* 基因自身的表达特性, 利用携有 不带启动子的 *lacZ* 基因的启动子检测载体 pGD926, 以 P-F 和 P-R 为引物, PCR 扩增获得大小 430 bp 的含 *dctP* 基因启动子序列的 DNA 片段, 构建 *dctP* 基因融合表达载体 *dctP-lacZ* (图 4), 通过三亲结合, 将融合表达载体分别转入野生型 A1501、 $\Delta ntrBC$ 、 $\Delta dctB$ 和 $\Delta rpoN$, 经 PCR 验证所得正确的转化子分别命名 A1501(*dctP-lacZ*)、*ntrBC*(*dctP-lacZ*)、*dctB* (*dctP-lacZ*)和 *rpoN*(*dctP-lacZ*)。

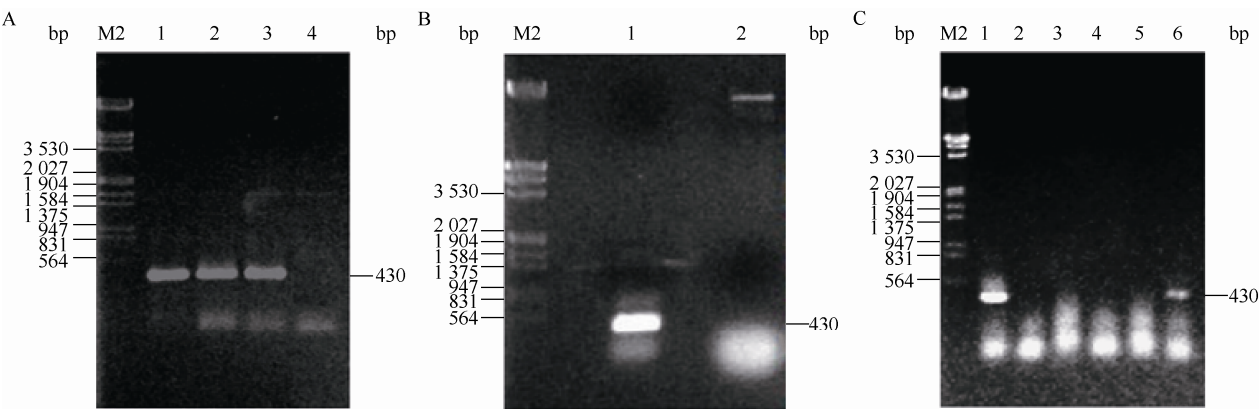


图 4 重组载体 *dctP-lacZ* 的构建

Figure 4 Construction of recombinant vector *dctP-lacZ*

注: M2: λ DNA/*Eco*R I+*Hind* III marker. A: 1、2、3: PCR 扩增得到 *dctP* 片段; 4: 阴性对照. B: 1: 经 *Hind* III/*Bam*HI 酶切的 *dctP* 片段; 2: 经 *Hind* III/*Bam*HI 酶切后的 pGD926. C: 1: 阳性对照; 2-5: 假阳性菌株; 6: 含有 *dctP-lacZ* 的菌株.

Note: M2: λ DNA/*Eco*R I+ *Hind* III marker. A: 1, 2, 3: *dctP* fragment PCR product; 4: Negative control. B: 1: Digestion of *dctP* by *Hind* III/*Bam*HI; 2: Digestion of pGD926 by *Hind* III/*Bam*HI. C: 1: Positive control; 2-5: False positive strains; 6: The confirmation of recombinant strains containing *dctP-lacZ* by RCR.

生长曲线测定结果表明 *dctP* 基因在四碳二羧酸的利用中发挥着重要作用。为了测定 *dctP* 基因的表达是否受四碳二羧酸的诱导,将 A1501 (*dctP-lacZ*) 分别于葡萄糖和四碳二羧酸(苹果酸、琥珀酸和延胡索酸)中进行诱导,通过测定 β -半乳糖苷酶活性验证 *dctP* 的表达。结果表明:葡萄糖对 *dctP* 基因的表达没有诱导作用,而苹果酸、延胡索酸和琥珀酸均对 *dctP* 基因的表达具有明显的诱导作用(图 5)。为了进一步验证 *dctP* 基因的表达是否受到其它调控因子的调控,又分别比较了在不同碳源诱导条件下, *ntrBC* 突变株、*dctB* 突变株和 *rpoN* 突变株中的 β -半乳糖苷酶活性,结果显示,在 $\Delta ntrBC$ 、 $\Delta dctB$ 和 $\Delta rpoN$ 中 *dctP* 基因的表达显著降低(图 5),而在 *dctP* 基因启动子区域发现了 RpoN 转录因子的保守结合位点(GG-N₁₀-GC),这表明在苹果酸、延胡索酸或琥珀酸诱导条件下 *dctP* 基因的表达是 RpoN 依赖型的,受到调控蛋白 NtrBC/DctB 的协同调控。

3 讨论

葡萄糖和四碳二羧酸中的琥珀酸、延胡索酸、苹果酸是固氮菌有效的呼吸底物,是生物固氮的重要能量供应物质。四碳二羧酸需要四碳二羧酸转运系统将其运输到菌体内才能被有效利用,因此通过

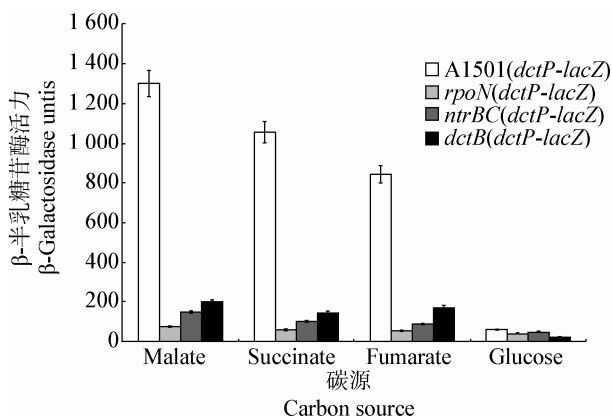


图 5 在苹果酸、琥珀酸、延胡索酸和葡萄糖诱导条件下 *dctP-lacZ* 在野生型和突变株中的表达

Figure 5 β -Galactosidase activities were measured in wild-type strain A1501 and mutants carrying *dctP-lacZ* transcriptional fusions grown with malate, succinate, fumarate or glucose

对固氮菌中四碳二羧酸转运系统的研究,增强细菌对四碳二羧酸的利用能力成为解决生物固氮能力不足的重要策略之一。

施氏假单胞菌 A1501 是一株具有利用根际分泌物(琥珀酸、延胡索酸、苹果酸)作为碳源和能源进行固氮特性的联合固氮菌。本实验室已经完成该菌的全基因组测序,通过生物信息学分析发现了完整的 Dct 系统,其中 *dctBD* 为四碳二羧酸转运调节基因, *dctPQM* 为结构基因^[16]。本实验室已有的研究表明 *dctB* 基因编码 Dct 系统中的调节蛋白 DctB,其在联合固氮菌四碳二羧酸的运输和利用过程中起着重要的作用。已有研究表明在紫色光合细菌(*Rhodobacter capsulatus*)中, TRAP (Tripartite ATP-independent periplasmic)载体已经被鉴定且描述为四碳二羧酸转运系统, TRAP 转运系统是由聚集在一起的 3 个基因编码的, *dctP* 基因编码四碳二羧酸结合蛋白, *dctQ* 和 *dctM* 编码四碳二羧酸转运体^[17],因此推测在 A1501 菌中 DctP 为四碳二羧酸结合蛋白。

本研究发现 *dctP* 的突变不但使菌株丧失了对四碳二羧酸的利用能力,而且也使菌株丧失了固氮能力。根据文献[18-19]报道,在根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)中,破坏四碳二羧酸系统后,导致菌体无法完成对四碳二羧酸的吸收和利用,最终形成了一种无法固氮的根瘤,类似的现象也出现在三叶草根瘤菌和豌豆根瘤菌,因此我们推测在 A1501 菌中 *dctP* 可能通过影响四碳二羧酸的转运而影响菌株的能量供应,进而参与 A1501 菌的固氮调控网络。

已有研究表明在铜绿假单胞菌中 DctPQM 被 RpoN 和 DctB/DctD 双组分系统调控^[20]。在根瘤菌和绿针假单胞菌中, RpoN 激活 *dctA* 和 *dctPQM* 操纵子的表达^[21-26]。本研究结果发现,与野生型中相比,在 *rpoN* 突变株中 *dctP* 表达量显著下调,而在 *dctP* 基因启动子区域发现了 RpoN 蛋白的保守结合位点,这说明在 A1501 菌中 *dctP* 基因的表达也是 *rpoN* 依赖型的;与野生型中相比,在 *dctB* 突变株中 *dctP* 的表达显著降低,说明 *dctP* 的表达可能受调控蛋白 DctB 的影响。有文献报道,在根瘤菌中

缺乏底物的条件下, 转运蛋白 DctA 和调控蛋白 DctB 可能在细胞质膜中相互起作用, 抑制 DctB 的自我磷酸化, 进而抑制四碳二羧酸运输系统编码基因的表达^[27-30]。在根瘤菌中 DctB 是典型的组氨酸激酶传感器, 负责检测四碳二羧酸^[31-33]。在枯草芽孢杆菌中 DctS/DctA/DctB 复合体形成四碳二羧酸传感功能单元, DctS 和 DctB 之间存在相互作用, DctB 对于 *dctA* 表达的有效诱导和增加 DctSR 双组分的特异性是必需的^[34]。因此, A1501 菌中调控蛋白 DctB 与转运蛋白 DctP 之间是否存在相互作用还有待深入的研究。

此外, 与其他菌株不同的是在 A1501 的染色体上存在两组 Dct 系统的编码基因, 一组是本研究中涉及的有序排列的 Dct 系统, 一组无序分散在基因组中。本研究表明单独突变 Dct 系统中的 DctP 蛋白编码基因可以造成菌株对于四碳二羧酸利用能力的完全丧失, 说明这套紧密排列的 Dct 系统对于 A1501 菌利用根系中的四碳二羧酸作为碳源是必需的, 而另一套无序分散的不完整系统可能是由于在菌株长期的进化过程中出现了基因的转移、功能的丢失或分化, 这进一步反映出菌株对环境的适应性。

参 考 文 献

- [1] Lin M, You CB. Root exudates of rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with *Alcaligenes faecalis*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1989, 22(6): 6-12 (in Chinese)
林敏, 尤崇杓. 水稻根分泌物及其与粪产碱菌的相互作用[J]. 中国农业科学, 1989, 22(6): 6-12
- [2] Tripathi AK, Mishra BM. Isolation and characterization of *Azospirillum lipoferum* locus that complements *Rhizobium meliloti* *dctA* and *dctB* mutations[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(5): 503-506
- [3] James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector[J]. Plant Cell Reports, 1989, 7(8): 658-661
- [4] Kelly DJ, Thomas GH. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001, 25(4): 405-424
- [5] Ronson CW, Astwood PM, Downie JA. Molecular cloning and genetic organization of C₄-dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 160(3): 903-909
- [6] Ronson CW, Astwood PM, Nixon TB, et al. Deduced products of C₄-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products[J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(19): 7921-7934
- [7] Park S. Structural studies on *Sinorhizobium meliloti* DctD related to ATP binding and activation[D]. Pennsylvania, USA: Master's Thesis of The Pennsylvania State University, 2002
- [8] Golby P, Kelly DJ, Guest JR, et al. Topological analysis of DcuA, an anaerobic C₄-dicarboxylate transporter of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(18): 4821-4827
- [9] Pos KM, Dimroth P, Bott M. The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(16): 4160-4165
- [10] Six S, Andrews SC, Uden G, et al. *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C₄-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct)[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(21): 6470-6478
- [11] Zientz E, Six S, Uden G. Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C₄-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(24): 7241-7247
- [12] Qiu YS, Zhou SP, Mo XZ, et al. Study of nitrogen fixing bacteria associated with rice root I. Isolation and identification of organisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1981, 21(4): 468-472 (in Chinese)
丘元盛, 周淑萍, 莫小真, 等. 稻根联合固氮细菌的研究 I. 菌种的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 1981, 21(4): 468-472
- [13] Yan YL, Yang J, Dou YT, et al. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(21): 7564-7569
- [14] Li HQ, Yang J, Ping SZ, et al. Research on the function of *dctB* gene encoding C₄-dicarboxylate transport regulation protein from *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Chinese High Technology Letters, 2005, 15(8): 67-71 (in Chinese)
李红权, 杨静, 平淑珍, 等. 固氮施氏假单胞菌四碳二羧酸转运调控基因 *dctB* 的功能研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(8): 67-71
- [15] Lin M, You CB. Denitrification and nitrogen fixation by *Alcaligenes faecalis*[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1987, 1(3): 3-10 (in Chinese)
林敏, 尤崇杓. 粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)的反硝化及固氮作用[J]. 核农学报, 1987, 1(3): 3-10
- [16] Yan CL, Lin M, Wan YS, et al. Transmembrane structure and function of *DctPQM* encoding C₄-dicarboxylate transport proteins from nitrogen-fixing *P. stutzeri* A1501[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(11): 1186-1190 (in Chinese)
闫春玲, 林敏, 宛煜嵩, 等. 固氮施氏假单胞菌四碳二羧酸转移酶 DctPQM 的跨膜结构分析与功能研究[J]. 科学通报, 2003, 48(11): 1186-1190
- [17] Forward JA, Behrendt MC, Wyborn NR, et al. TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(17): 5482-5493
- [18] Shaw JG, Hamblin MJ, Kelly DJ. Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C₄-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(12): 3055-3062
- [19] Finan TM, Wood JM, Jordan DC. Succinate transport in *Rhizobium leguminosarum*[J]. Journal of Bacteriology, 1981, 148(1): 193-202
- [20] Bolton E, Higginson B, Harrington A, et al. Dicarboxylic acid transport in *Rhizobium meliloti*: isolation of mutants and cloning of dicarboxylic acid transport genes[J]. Archives of Microbiology, 1986, 144(2): 142-146
- [21] Valentini M, Storelli N, Lapouge K. Identification of C₄-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(17): 4307-4316
- [22] Nam HS, Anderson AJ, Yang KY, et al. The *dctA* gene of *Pseudomonas chlororaphis* O6 is under RpoN control and is

- required for effective root colonization and induction of systemic resistance[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 256(1): 98-104
- [23] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(6799): 959-964
- [24] Davies SJ, Golby P, Omrani D, et al. Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(18): 5624-5635
- [25] Reid CJ, Poole PS. Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(10): 2660-2669
- [26] Wang YK, Park S, Nixon BT, et al. Nucleotide-dependent conformational changes in the σ^{54} -dependent activator DctD[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(20): 6215-6219
- [27] Watson RJ, Chan YK, Wheatcroft R, et al. *Rhizobium meliloti* genes required for C₄-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(2): 927-934
- [28] Yurgel SN, Kahn ML. Dicarboxylate transport by rhizobia[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(4): 489-501
- [29] Yarosh OK, Charles TC, Finan TM. Analysis of C₄-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*[J]. Molecular Microbiology, 1989, 3(6): 813-823
- [30] Watson RJ. Analysis of the C₄-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of *dctA*, *dctB*, and *dctD*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1990, 3(3): 174-181
- [31] Liu JW, Yang JG, Wen J, et al. Mutational analysis of dimeric linkers in peri- and cytoplasmic domains of histidine kinase DctB reveals their functional roles in signal transduction[J]. Open Biology, 2014, 4(6): 140023
- [32] Ronson CW, Lyttleton P, Robertson JG. C₄-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981, 78(7): 4284-4288
- [33] Wang YP, Birkenhead K, Boesten B, et al. Genetic analysis and regulation of the *Rhizobium meliloti* genes controlling C₄-dicarboxylic acid transport[J]. Gene, 1989, 85(1): 135-144
- [34] Graf S, Schmieden D, Tschäuner K, et al. The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C₄-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(5): 1084-1093

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果，产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012、2013、2014、2015年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续4年获得“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选300种“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助；2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2017年每册定价80元，全年960元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413