

# 豌豆根瘤菌 *gshR* 基因的抗氧化和共生固氮作用

程国军 谢婧 殷杰 彭杨

(中南民族大学 生命科学学院, 武汉 430074)

**摘要** 目的: 研究豌豆根瘤菌 RL3841 的谷胱甘肽还原酶编码基因 *gshR* 的功能. 方法: 采用基因同源重组构建了豌豆根瘤菌 *gshR* 基因突变株 RLgshR, 探讨了基因突变对根瘤菌抗氧化和共生固氮的影响, 利用实时荧光定量 RT-PCR 检测 *gshR* 基因的 mRNA 表达水平. 结果: *gshR* 基因缺失不影响菌株在 AMS 基础培养基中的生长能力, 但突变株对氢过氧化枯( CuOOH) 和较高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化物敏感. 结论: *gshR* 基因突变株 RLgshR 形成正常固氮根瘤, *gshR* 基因的表达不受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和共生环境诱导.

**关键词** 豌豆根瘤菌; *gshR* 基因; 抗氧化功能; 共生固氮; 荧光定量 RT-PCR.

中图分类号 Q935 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)04-0031-04

## Antioxidation and Symbiotic Nitrogen Fixation of *gshR* Gene in *Rhizobium leguminosarum*

Cheng Guojun, Xie Jing, Yin Jie, Peng Yang

(College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Objective: To study the function of glutathione reductase gene *gshR* in *rhizobium leguminosarum*. Method: *gshR* mutant RLgshR was constructed through homologous recombination, and the effect of gene mutation on its symbiosis nitrogen fixation and antioxidative function were explored. Quantitative real-time RT-PCR was performed to detect mRNA expression of *gshR* gene. Results: The growth ability of RLgshR in AMS basal medium was not affected by the lack of *gshR* gene; however, the mutant strain was sensitive to CuOOH and high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conclusion: The *gshR* mutant RLgshR formed nodules with normal nitrogen-fixing activity and *gshR* gene expression can not be induced under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress and symbiotic condition.

**Keywords** *Rhizobium leguminosarum*; *gshR* gene; antioxidant; symbiotic fixation; real-time qRT-PCR

根瘤菌为革兰氏阴性土壤菌,属于变形菌门,能与某些豆科植物建立共生关系.根瘤菌侵染宿主后,宿主将分泌黄酮类物质与结瘤因子作用促使结节形成.根瘤菌进入植物根系皮层细胞分化成类菌体.类菌体合成固氮酶复合物及其他蛋白质,固定氮转化为氨或丙氨酸提供给寄主植物,同时植物提供碳水化合物作为根瘤菌碳和能量的来源<sup>[1]</sup>.这种共生关系对于氮肥不足或不能自生合成氮源的农业作物有重要影响.

谷胱甘肽还原酶(GshR)是一个约为 125 kDa 的蛋白质,广泛存在于细胞核、线粒体、过氧化物酶体和内质网中,在保护生物体方面起关键作用<sup>[2]</sup>.GshR 是依赖 NADPH 的氧化还原酶家族的一员,是在抗坏血酸-谷胱甘肽(ASA-GSH)循环中作为 ROS 解毒至关

重要的抗氧化酶.高效的 GshR 可维持细胞中 GSH/GSSH 处于高值,对 GSH 抗氧化剂的功能非常重要<sup>[3]</sup>.Ku M 等<sup>[4]</sup>发现白色念珠菌 *gshR* 基因突变株丧失硫氧还蛋白 1、2 的基因活性,细胞成丝情况、抗氧化性质及丙酮醛含量明显下降,以致无法存活.将谷胱甘肽还原酶编码基因导入大肠杆菌后转入载体,在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 环境下表达的 GshR 融合蛋白活性高于自然条件下 4 倍,表明 GshR 蛋白在机体处于不利环境时有解毒作用.李智燕等<sup>[5]</sup>对天蓝苜蓿和紫花苜蓿根瘤菌 CAT(过氧化氢酶)、GshR 等抗氧化酶系研究表明在高浓度铝作用下,GshR 失去防御能力而被破坏,活性降低.马占强等<sup>[6]</sup>人对苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 研究表明该菌株可通过提高 SOD(超氧化物

收稿日期 2017-05-15

作者简介 程国军(1976-)男,教授,博士,研究方向:环境微生物学, E-mail: chengguojun@mail.scuec.edu.cn

基金项目 湖北省自然科学基金资助项目(2016CFC771);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZW15112)

歧化酶)、GshR 等酶的活性,降低铜离子的毒害效应。Muglia C 等<sup>[7]</sup>构建了热带根瘤菌 *Rhizobium tropici* GSH 合成酶基因缺失突变株,该突变株接种菜豆宿主形成低固氮活性的不正常根瘤。

豌豆根瘤菌 3841 *gshR* 基因编码谷胱甘肽还原酶,本文通过构建豌豆根瘤菌 *gshR* 基因突变株,进一步研究谷胱甘肽还原酶基因突变对根瘤菌抗氧化以及共生固氮的影响,为阐明谷胱甘肽还原酶在根瘤菌抗氧化体系中的作用机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

实验菌株为野生型豌豆根瘤菌 RL3841 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ ,RLgshR 为本次试验构建的 RL3841 突变体,克隆载体 pK19mob 由英国牛津大学 Philip S Poole 教授提供,甜豌豆种子为本实验室保存,大肠杆菌用 LB 培养基于 37 °C 培养,豌豆根瘤菌用 AMS 或 TY 培养基于 30 °C 培养,豌豆根瘤菌培养所用抗生素(Sigma)及浓度:新霉素(Neo) 80  $\mu$ g/mL,链霉素(Str) 500  $\mu$ g/mL,壮观霉素(spe) 100  $\mu$ g/

mL;大肠杆菌培养所用抗生素及浓度:四环素(Tc) 5  $\mu$ g/mL,卡那霉素(Km) 20  $\mu$ g/mL。

限制性内切酶(*Xba* I、*Bam*H I、*Hind* III 等)、T4 DNA 连接酶、RNAiso Plus、限制性内切酶均购于 TaKaRa 公司;Taq DNA 聚合酶、phusion 高保真酶购于 Thermo Scientific 公司;PCR 产物及 DNA 凝胶回收试剂盒等购于博大泰克公司;反转录所用试剂为 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit, FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)。

### 1.2 RLgshR 突变菌株的构建

构建 *gshR* 基因突变株参照田梦洋等<sup>[8]</sup>方法,以 RL3841 总 DNA 为扩增模板, *gshR* 的上游和下游引物(见表 1)进行 PCR 反应,将 pK19mob 载体与目的片段分别用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后,经 T4 DNA 连接酶过夜连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,转化子经检测后,获得阳性重组转化子 pKgshR,再进行三亲本结合实验,其中 RL3841 为受体菌,大肠杆菌 pKgshR 为供体菌,大肠杆菌 pRK2013 为辅助菌,通过抗生素平板及以 M13/RLgshRMP 为引物的 PCR 验证,最终获得 *gshR* 基因突变菌株 RLgshR。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>gshR</i>	AAATCT AGA TGC GTG CCG AAA AAG CTC TT	AAAAAG CTT AGC GTG TCA TGG CAG AGG AT
RLgshRMP	TTCGGTGTTCGGATCGCGCC	
pK19	ATC AGA TCT TGA TCC CCT GC	GCA CGA GGG AGC TTC CAG GG
M13	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC
QgshR	CGCCGC CTC GCT CGG CAA GA	ATG CTC ATG GAA CTG CGA AG
<i>gyrB1</i>	GGC ATC ACC AAA AGG GAA AA	GCG AGG AGA ATT TCG GAT CA

注:\_\_\_为限制性酶切位点

### 1.3 菌株的生长试验

#### 1.3.1 菌株的自由生长

将已活化的 RLgshR 与 RL3841 菌株接种于添加相应抗生素的 TY 培养基,30 °C 培养 2 d 后,用 AMS 培养基洗脱、重悬,使其初始  $D(600 \text{ nm}) = 0.01$ ,30 °C 200 r/min 恒温摇床培养,间隔取样测其  $D(600 \text{ nm})$  3 组平行试验。

#### 1.3.2 抑菌试验

使用处于对数生长期的 RLgshR 和 RL3841 菌株,用蒸馏水洗脱,使菌悬液  $D(600 \text{ nm}) = 1$ ,涂布于 AMS 培养基平板,待平板晾干后,分别将含有不同浓度的过氧化氢( $\text{CuOOH}$ )、双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ )滤纸片置于平板中央,30 °C 培养 24 h,测量抑菌圈直径,3 组平行试验。 $\text{CuOOH}$  溶于 95%无水乙醇,以润有 95%无水乙醇的圆滤纸片作为对照。

### 1.4 荧光定量 RT-PCR

将活化的 RL3841 接种于 AMS 液体培养基,30 °C 200 r/min 摇床培养至对数期时  $D(600 \text{ nm}) = 0.3 \sim 0.6$ ,每种菌 3 个重复,菌体离心收集后,用 0.5 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 1 h,对照组用生理盐水处理,采用 Trizol 法提取总 RNA,经 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒将其反转录成 cDNA,再对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR, *gshR* 基因荧光定量 PCR 的引物见表 1, *gyrB1* 为内参基因。

类菌体 RNA 提取时,将培养 25 d 的豌豆植株摘取根瘤放置于研钵中,加入液氮,研磨至粉状,其后续 RNA 提取和 cDNA 制备等步骤与细菌 RNA 提取相同,其中对照组为无  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理的 AMS 自生培养中对数期的 3841 菌株, *gyrB1* 为内参基因,对类菌体中 *gshR* 基因进行荧光定量分析。

1.5 植物盆栽试验

采用蛭石作为基质种植甜豌豆<sup>[8]</sup>.将实验室保存的甜豌豆经 95%乙醇、2%次氯酸钠水溶液表面消毒后,无菌水清洗播种于已灭菌并含有营养液的蛭石塑料烧杯中,每杯 3 颗豌豆,每种菌种 3 组重复.在每颗豌豆上接种 1 mL 相应的菌悬液.播种完后用蛭石掩埋、保鲜膜封口,置于光照培养箱中培养.控制培养条件: 22 ℃、湿度 70%、光照培养 16 h; 20 ℃、湿度 70% 黑暗培养 8 h.盆栽 1 周后,待幼苗生长,用无菌牙签将保鲜膜挑破,让幼苗长出,定期添加营养液.4 周后利用乙炔还原法测量根瘤固氮酶活.

2 结果与分析

2.1 RLgshR 突变菌株的构建

按照程国军等<sup>[9]</sup>突变体构建的方法,在含有链霉素和新霉素的抗性平板上长出单菌落.以利用 M13/RLgshRMP 为引物,对重组子进行 PCR 验证,扩增出约 650 bp 的基因片段,得到 *gshR* 目的基因突变株 RLgshR.

2.2 *gshR* 基因突变对菌株生长的影响

将已活化的 RLgor 与 RL3841 菌株以初始  $D(600\text{ nm})$  为 0.01 接种于 AMS 液体培养基,摇床培养,间隔取样测其  $D(600\text{ nm})$ ,每个菌株 3 次重复,并绘制生长曲线(见图 1).

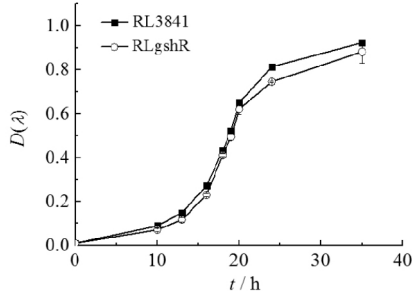


图 1 野生型 3841 菌株与 RLgshR 菌株在 AMS 培养基中的生长情况

Fig.1 Growth curves of wild type 3841 and RLgshR strain in AMS medium

由图 1 可知: RLgshR 与 RL3841 菌株的生长变化趋势相同.经显著性方差分析,两种菌株在细菌数量增长上无显著差异,说明 *gshR* 基因突变不影响豌豆根瘤菌的正常生长.

2.3 *gshR* 基因突变对菌株抗氧化能力的影响

2.3.1 *gshR* 基因突变对根瘤菌抗  $\text{H}_2\text{O}_2$  的影响

无机氧化物  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 *gshR* 基因突变株的抑菌能力结果见表 2.当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 20 mmol/L 时,RLgshR

和 RL3841 的抑菌圈直径无显著差异;但当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度分为 100, 500, 1000 mmol/L 时,RLgshR 的抑菌圈的直径分别为 10.87, 17.60, 21.53 cm, 显著大于 RL3841 的抑菌圈直径( $P < 0.05$ ),说明 *gshR* 基因突变虽不会影响豌豆根瘤菌抗低浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  的能力,但会严重影响其对较高浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  的抗性.

表 2 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用下 RL3841 和 RLgshR 的抑菌圈直径  
Tab.2 Inhibition zone diameters of RL3841 and RLgshR under different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$

$c(\text{H}_2\text{O}_2) / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑菌圈直径 / cm	
	RL3841	RLgshR
20	3.40±0.40	4.07±0.21
100	6.53±0.35	10.87±0.38*
500	13.57±0.35	17.60±0.46*
1000	18.63±0.40	21.53±0.42*

\* 与野生株 RL3841 相比  $P < 0.05$

2.3.2 *gshR* 基因突变对根瘤菌抗  $\text{CuOOH}$  的影响

有机氧化物  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 *gshR* 基因突变株的抑菌能力结果见表 3.当  $\text{CuOOH}$  浓度分别为 5, 20, 100, 500 mmol/L, 突变株 RLgshR 抑菌圈直径分别为 3.50, 8.50, 15.17, 18.50 cm, 均显著大于 RL3841 的抑菌圈直径( $P < 0.05$ ),表明 *gshR* 基因突变会严重影响根瘤菌抗有机氧化物  $\text{CuOOH}$  的能力.

表 3 不同浓度  $\text{CuOOH}$  作用下 RL3841 和 RLgshR 菌株的抑菌圈直径

Tab.3 Inhibition zone diameters of RL3841 and RLgshR under different concentrations of  $\text{CuOOH}$

$c(\text{CuOOH}) / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑菌圈直径 / cm	
	RL3841	RLgshR
5	2.30±0.66	3.50±0.30*
20	5.73±0.47	8.50±0.78*
100	11.77±0.81	15.17±0.50*
500	15.40±0.56	18.50±0.79*

\* 与野生株 RL3841 相比  $P < 0.05$

2.4 植物盆栽试验

盆栽 4 周后, *gshR* 基因突变株 RLgshR 接种豌豆植株形成红色有效根瘤.将培养 4 周的豌豆植株利用乙炔还原法测定根瘤固氮酶活(见图 2).结果表明 *gshR* 基因突变对根瘤菌的共生表型和共生酶活无显著影响.

2.5 荧光定量 RT-PCR 分析 *gshR* 基因的表达量

用 0.5 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 1 h, 豌豆根瘤菌 3841 *gshR* 基因的表达量为生理盐水对照组表达量的 0.96 ± 0.69 倍;其在形成 25 d 根瘤类菌体中表达量为在自生条件下的 1.26 ± 0.17 倍.经统计分析, *gshR* 基因表达无显著差异,说明 *gshR* 基因的表达不受  $\text{H}_2\text{O}_2$  和共生环境的诱导.

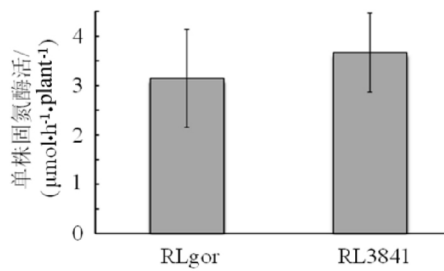


图2 RLgshR 和 RL3841 的共生固氮酶活

Fig.2 Symbiotic nitrogenase activity of RLgshR and RL3841

### 3 讨论

ROS 可与氧化应激反应,无靶向性作用于脂质、蛋白质和 DNA 以诱导病理反应.豆科植物根瘤细胞已进化出防御系统,可维持细胞的氧化还原状态并减轻氧化应激所造成的损害<sup>[10]</sup>,谷胱甘肽还原酶能将氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原成还原型谷胱甘肽(GSH),是活性氧的清除提供重要的还原力<sup>[7]</sup>.本研究发现:豌豆根瘤菌 *gshR* 基因编码谷胱甘肽还原酶,该基因突变对根瘤菌 RL3841 的生长无影响,但是对有机氧化物  $\text{CuOOH}$  和较高浓度的无机氧化物  $\text{H}_2\text{O}_2$  十分敏感.在白念珠菌 *Candida albicans*<sup>[4]</sup>、*E.coil* 等细菌中,谷胱甘肽还原酶已被证明在抗氧化、机体解毒方面有重要作用.在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* SK11<sup>[11]</sup> 中发现菌株经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理,其死亡率高出自然条件下正常菌株的 5.6 倍. Riccillo P M 等<sup>[12]</sup> 研究发现热带根瘤菌 *R. tropici* 谷胱甘肽合成酶基因突变会显著降低根瘤菌抗酸和氧化能力.经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理野生型菌株 3841 中 *gshR* 基因的表达量无显著变化,说明 *gshR* 的表达不受外界  $\text{H}_2\text{O}_2$  的诱导. Soo J S 等<sup>[13]</sup> 研究发现,将 *Tigriopus japonicus* 置于不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液中处理 1 h,谷胱甘肽还原酶编码基因的表达量并无显著差异.

已有研究说明根瘤菌谷胱甘肽缺失突变会显著降低根瘤固氮酶活<sup>[7]</sup>.但本研究中豌豆根瘤菌 *gshR* 基因缺失对植物共生和根瘤菌固氮酶活均无影响,由于其他抗氧化系统对缺失有补偿作用,如 CAT 酶、过氧化氢酶氧化应激系统可弥补细胞缺失 GSH 所造成的不足.

#### 参 考 文 献

- [1] Spaink H P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria[J]. Annu Rev Microbiol 2000 54(1): 257-288.  
 [2] Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase

and related enzymes on cellular redox homeostasis network [J]. Free Radic Bio Med 2016 95: 27-42.

- [3] Herath H M, Wickramasinghe P D, Bathige S D, et al. Molecular identification and functional delineation of a glutathione reductase homolog from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Insights as a potent player in host antioxidant defense [J]. Fish Shellfish Immun, 2017 60: 355-367.  
 [4] Ku M, Baek Y U, Kwak M K, et al. *Candida albicans* glutathione reductase downregulates Efg1-mediated cyclic AMP/protein kinase. A pathway and leads to defective hyphal growth and virulence upon decreased cellular methylglyoxal content accompanied by activating alcohol dehydrogenase and glycolytic enzymes [J]. BBA-Gen Subjects 2017, 1861(4): 772-788.  
 [5] 李智燕, 邢学峰, 唐华, 等. 铝和酸胁迫对苜蓿根瘤菌生长和抗氧化酶系的影响[J]. 草业学报, 2013, 22(3): 146-153.  
 [6] 马占强, 赵龙飞, 王莉, 等. 铜胁迫对苜蓿中华根瘤菌抗氧化酶系的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(6): 1058-1063.  
 [7] Muglia C, Comai G, Spegazzini E, et al. Glutathione produced by *Rhizobium tropici*, is important to prevent early senescence in common bean nodules [J]. Fems Microbiol Lett 2008 286(2): 191-198.  
 [8] 田梦洋, 何冬兰, 李晓华, 等. 豌豆根瘤菌 *ohrB* 基因的抗氧化和共生固氮表型[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 54-60.  
 [9] 程国军, 彭杨, 殷杰, 等. *OsmC* 基因在豌豆根瘤菌抗氧化和共生中的功能[J]. 中南民族大学学报(自然科学版) 2017 36(2): 25-29.  
 [10] Corticeiro S C, Lima A, Figueira E M. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure [J]. Enzyme Microb Tech 2006 40(1): 132-137.  
 [11] Li Y, Hugenholtz J, Abec T, et al. Glutathione Protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress [J]. Appl Environ Microbiol 2003 69(10): 5739-5745.  
 [12] Riccillo P M, Muglia C I, de Bruijn F J, et al. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance [J]. J Bacteriol 2000 182(6): 1748-1753.  
 [13] Seo J S, Lee K W, Rhee J S, et al. Environmental stressors (salinity, heavy metals,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* [J]. Aquat Toxicol 2006 80(3): 281-289.

(责任编辑 刘 钊)