

## 紫云英参与共生固氮的2个新结瘤素基因的分离与鉴定

丑敏霞 魏新元 陈大松 周俊初

(西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100; 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070. E-mail: [minxia95@yahoo.com](mailto:minxia95@yahoo.com))

**摘要** 通过抑制差减杂交, 比较了接种华葵中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*) 7653R的紫云英(*Astragalus sinicus*)的根与未接种根瘤菌的对照根在转录水平上的差异, 建立了紫云英共生结瘤过程中的差异表达基因文库, 并在此基础上证实了2个结瘤特异性基因 $As\ C259$ 和 $AsG2511$ 。其可读框显示,  $As\ C259$ 和 $AsG2511$ 编码的多肽链长度分别为134和58个氨基酸, 其氨基端均含有一个信号肽。结构域查询结果揭示,  $As\ C259$ 编码的多肽链包含了2个N-糖基化位点、一个依赖于cAMP的蛋白激酶(PKA)和cGMP依赖的蛋白激酶(PKG)磷酸化位点以及一个酪蛋白激酶(CK2)磷酸化位点。BlastP同源搜索表明,  $As\ C259$ 多肽链仅与一个来自羽扇豆(*Lupinus luteus*)根瘤的新结瘤素蛋白表现出较低的同源性。对于 $AsG2511$ 多肽链, 没有发现任何明显的同源序列。Virtual Northern blot和半定量RT-PCR分析表明,  $As\ C259$ 和 $AsG2511$ 均只在接种根中表达, 说明它们确为结瘤特异性基因; 另外, 这2个基因的表达比豆血红蛋白基因晚2~4 d, 应为晚期结瘤素基因。

**关键词** 结瘤特异性基因 紫云英(*Astragalus sinicus*) 结瘤素 共生 抑制差减杂交

豆科植物与根瘤菌(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)、中华根瘤菌(*Sinorhizobium*)、中生根瘤菌(*Mesorhizobium*)及固氮根瘤菌(*Azorhizobium*) (统称为根瘤菌)共生互作的结果导致了新的植物器官根瘤的形成。根瘤菌生活在根瘤中, 它们具有将氮气转化为能被植物同化的氨的能力。这种共生关系的建立起始于共生双方的分子对话。植物分泌类黄酮至根际, 诱导根瘤菌的脂质寡聚糖信号分子——结瘤因子的表达。结瘤因子被宿主植物特异性地识别后, 根迅速作出一系列反应, 一些结瘤素基因被表达, 某些皮层细胞开始分裂启动根瘤的形成<sup>[1]</sup>。在共生结瘤过程中, 那些被诱导表达或表达增强的植物基因被命名为结瘤素基因, 其表达产物称为结瘤素<sup>[2]</sup>。根据表达时间的早晚, 结瘤素基因可以分为早期结瘤素基因和晚期结瘤素基因, 前者在开始固氮前表达, 后者则在发育完全的、成熟的根瘤中表达<sup>[3]</sup>。

从结构上看, 根瘤一般分为不定型瘤和定型瘤。前者主要在温带豆科植物的根上形成, 它们具有明显的分层: 层为顶端分生组织; 层为侵染区; 随后是富含淀粉粒的~中间带; 层为固氮区, 其中充满类菌体; 最后是接近衰老的层<sup>[4]</sup>。定型瘤通

常形成于热带豆科植物上, 在成熟的根瘤内, 包含固氮细胞的中央组织是均一的<sup>[5,6]</sup>。

在中国、日本、韩国等亚洲国家, 紫云英(*Astragalus sinicus* L.)作为绿肥、饲料及蜜源植物被广泛种植。在我国, 它还是一种重要的中药植物。它和华葵中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)有着专一的共生关系, 互作的结果是形成不定型瘤<sup>[7]</sup>。另外, 它也能与内生菌根真菌(*Glomus intraradices*)建立共生关系。除了植株矮小、生育期短这些生理特征以外, 紫云英还是一个专一性很强的寄主植物, 通常只与从自身分离的根瘤菌共生结瘤, 唯一的例外报道是一个自*Astragalus ciceri*分离的根瘤菌菌株, 能与紫云英交叉结瘤<sup>[8]</sup>。目前为止, 人们对紫云英在共生结瘤中相关信息的了解非常有限。Fujie等人<sup>[9]</sup>曾通过差异显示法分离了100多个在紫云英根瘤中特异表达或表达增强的cDNA克隆, 并证实了一个新的结瘤素基因 $AsNODc22$ 。 $AsNODc22$ 能够编码一个18 kD功能未知的蛋白质。随后, Naito等人<sup>[10]</sup>报道了另一个结瘤特异性基因 $AsNODf32$ , 这个基因编码的多肽类似于Cys蛋白酶。

为了对紫云英的共生结瘤过程作较为系统的研究, 以获得新的结瘤素基因和更多有用的分子探针,

本研究利用抑制差减杂交(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)技术比较研究了紫云英接种根系和未接种根系的基因转录情况,建立了其结瘤根的差异表达cDNA文库。目前已有 14 个结瘤特异性或结瘤增强性基因被报道。这些基因所编码的多肽包括了Usp家族(universal stress protein family)类似物、半胱氨酸簇蛋白家族(cysteine cluster proteins, CCP)同源物以及脂类转运蛋白家族(lipid transfer protein, LTP)类似物<sup>[11,12]</sup>。本文报道了另外两个新的结瘤特异性基因*AsG2511*和*As C259*及其表达方式,并结合序列查询及结构域分析讨论了它们的功能。

## 1 材料与amp;方法

( ) 材料。将紫云英种子浸入 95%(体积比)的乙醇 5 min,再以 5%(体积比) NaClO 表面消毒 10 min,无菌水洗涤 8 次,黑暗中于室温下发芽 2 d。将发芽的种子无菌条件下浅播于灭菌砂钵中,浇溉 Fährhaus 无氮营养液<sup>[13]</sup>,按照每天 16 h 光照/8 h 暗期于 18~22 培养。6 d 后,接种 *Mesorhizobium huakuii* 7653R。

( ) 总 RNA 的分离。用 Trizol 试剂(Invitrogen, CA, USA)提取,具体操作按说明书进行。分别提取紫云英接种后 21~26 d 的根及相应苗龄未接种根的 RNA,进行 SSH, virtual Northern blotting 及 cDNA 末端快速扩增(RACE)分析。

为了研究基因的表达情况,分别从接种后 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15 及 21 d 的根以及接种后 27 d 的除去根瘤的根、根瘤、叶片、叶柄中提取 RNA。同时,分别提取播种后 4, 6 及 33 d 的未接种根中的 RNA 作为对照,进行半定量 RT-PCR 分析。

( ) SMART cDNA 的合成。利用 ClonTech SMART PCR cDNA Synthesis kit (ClonTech, CA, USA) 进行 cDNA 的合成与扩增,操作按试剂盒说明书进行,略作如下改动:取 1 μg 纯化后的总 RNA,加入 cDNA 合成(CDS)引物及 SMART 寡聚核苷酸,42 温育 1 h,合成第一链 cDNA。随后,向 10 μL 第一链反应体系中加入 40 μL Tricine-EDTA 缓冲液,72 温育 7 min。取 1 μL 上述稀释后的单链 cDNA 为模板进行长距离(LD) PCR。反应体系为 100 μL。反应程序为: 95 , 15 s, 65 , 30 s, 68 , 6 min, 共 17 个循环。于 PTC-100™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research™ Inc., Massachusetts, USA) 上进行扩增。此 PCR 产物将被用作 virtual Northern blot。

( ) SSH 和差减 cDNA 文库的构建。利用 ClonTech

PCR-Select cDNA Subtraction kit 进行文库的构建。简言之,获取总 RNA 之后,以链霉素亲和磁珠法分离 poly(A) RNA (PolyATtract® mRNA Isolation System, Promega, USA)。分别以 2 μg 紫云英接种后 21~26 d 的根及相应苗龄未接种根中的 poly(A) RNA 为模板合成 cDNA,随后用限制性内切酶 *Rsa* 酶切消化。酶切后的 cDNA 片段作为 Tester 和 Driver 进行正向和反向杂交。正向杂交中,以来自接种根的 cDNA 片段为 Tester 进行目的基因的筛选;反向杂交中,则以来自未接种根的 cDNA 片段为 Tester,去除那些非特异性表达的基因。Tester cDNA 两端分别连接两个不同的接头,该接头含有与 PCR 引物配对的序列及克隆位点,Driver cDNA 不加接头。将 Tester cDNA 分为两份,变性,分别与变性后的 Driver cDNA 差减杂交。紧接着进行第二次杂交,亦即差减后的两份 Tester cDNA 之间的杂交。最后,扩增 Tester cDNA 中特异表达的 cDNA 片段,并克隆到 pGEM®-T 载体(Promega)上。

( ) 差示筛选。通过斑点杂交进行。随机挑取上述转化子并提取质粒,取 1 μL 质粒作模板,用 T7/SP6 通用引物进行 PCR 扩增。各取 8 μL 扩增产物,加入 0.4 mol/L NaOH (新配)和 10 mmol/L EDTA (pH 8.2)变性。取变性后的各样品 2 μL,点于带正电荷的尼龙膜上(Amersham Pharmacia Biotech Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, England),共点 4 张重复拷贝膜。点好的膜于 2 × SSC 中漂洗,晾干,80 烘烤 2 h。4 张重复拷贝膜分别与 4 个探针(来自接种根的差减 cDNA 探针、来自接种根的未差减 cDNA 探针、来自未接种对照根的差减 cDNA 探针及其未差减 cDNA 探针)杂交。

探针的制备如下:相应的 cDNA 分别以 *Rsa* 消化,切除接头,随后以 <sup>32</sup>P 标记(Random Primer DNA Labeling kit, TaKaRa, 大连,中国)。在含有 5 × SSC, 5 × Denhardt's, 0.5% (质量体积比)SDS 和 100 μg/mL 变性鲑鱼精 DNA 片段的预杂交液中,4 张点有样品的膜于 65 预杂交 14 h。加入含探针的杂交液后,65 下杂交过夜。然后,于 65 严紧条件下洗膜。洗膜条件为: 2 × SSC/0.5% SDS, 2 次; 1 × SSC/0.5% SDS, 2 次; 0.1 × SSC, 0.5% SDS, 2 次。洗膜结束后,用 X-膜于 -80 放射自显影。

通过比较 4 张拷贝膜上的杂交情况来初步筛选差示片段。选取仅与来自接种根的探针杂交或杂交

信号明显高于来自未接种根的探针的克隆测序, 并进行 Blast 分析。

( ) Virtual Northern blotting. 为了进一步验证所选克隆是否代表真正的目的基因, 我们选取其中的部分克隆, 以 T7, SP6 为引物扩增其中的插入片段, 酶切去接头并进行探针标记。分别取来自紫云英接种根和未接种根的 SMART cDNA 25  $\mu$ L, 于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, 变性, 转膜。探针标记与杂交过程同上面的差示筛选。同时, 扩增并标记一段泛素 cDNA<sup>[14]</sup> 片段作为阳性对照。

( ) 半定量 RT-PCR 分析。取不同来源的总 RNA 各 1  $\mu$ g, DNase (无 RNase, TaKaRa) 消化以去除基因组 DNA。以纯化后 RNA 为模板合成并扩增 cDNA。以 5'-CACCAATATAACACATACTTA-3' 和 5'-CATCAAAGTAGTATGGCAA-3' 为引物扩增 *As C259*, 以 5'-GAGAAGAGTTATGGCAGC-3' 和 5'-CCATTGT-TGATAATTTTCAC-3' 为引物扩增 *AsG2511*, 具体操作参考 One Step RNA PCR kit (AMV) (TaKaRa), 即 50  $\mu$ L 反应体系于 50  $^{\circ}$ C 保温 30 min, 反转录合成第一链 cDNA; 94  $^{\circ}$ C 2 min 失活反转录酶; 接着开始 PCR 循环: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火(温度依引物而不同) 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取指数扩增期内的最大循环数(预实验中取不同循环数时的 PCR 产物进行分析, 结果未显示): *AsG2511* 为 24 次, *As C259* 为 28 次。5  $\mu$ L 产物于 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 利用 Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Eastman Kodak Company, New Haven, CT, USA) 软件分析 mRNA 的相对积累量, 所得数据进行统计分析。以 18S rRNA 的一个片段作为阳性对照, 其 RT-PCR 过程同上, 只是总循环数为 15 个。RT-PCR 过程至少重复 3 次。

( ) RACE 法获得目的基因的全长 cDNA。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification kit (Clontech) 和基因特异性引物(GSP) 扩增目的基因的 5' 及 3'-cDNA 末端; 随后, 根据此末端 cDNA 序列设计 5' 和 3'-末端引物, 以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板, 通过 LD-PCR 扩增目的基因的全长 cDNA。同时, 全长 cDNA 的克隆还可以通过 5' 及 3'-RACE 产物重叠部分的拼接获得。5'-RACE 中用于 *As C259* 的 GSP1 为 5'-CAGCAGTAATTGGAGAATGATCGCTCGA-3', 用于 *AsG2511* 的 GSP1 为 5'-CATAAAATTGTCACATCGCAAATCCATCGAC-3'; 3'-RACE 中用于 *As C259* 的 GSP2 为 5'-AGCCCATGATGAAGAGCGTGAAC-

CAAAT-3', 用于 *AsG2511* 的 GSP2 为 5'-TGATAATGATTGTTTTACGGAGTGTCTCCGTG-3'。全长 cDNA 随后与 pGEM-T 载体(Promega) 相连。

( ) 序列分析和统计分析。目的基因的氨基酸序列推测利用 BioEdit 软件进行<sup>[15]</sup>。同源搜索利用 Blast 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行。理论上的等电点(pI) 和分子量(MW) 通过 Compute pI/MW 软件预测(<http://ca.expasy.org/tools/>)。通过对 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/>)、Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/>) 和 PROSITE (<http://www.predictprotein.org/>) 数据库的查询, 证实氨基酸保守结构域。SignalP 3.0 Server 软件预测信号肽的存在及其可能的切割位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)。二级结构分析通过 PSIPREDView 程序<sup>[16]</sup> 进行。

利用 SPSS 11.0 for Windows 中的单向方差分析 (One-Way ANOVA) 程序, 对半定量 RT-PCR 中的数据进行分析。

## 2 结果

### 2.1 差减 cDNA 文库的构建和 SSH cDNA 序列分析

SSH cDNA 片段连接 T-载体并转化大肠杆菌后挑取了 400 多个转化子, 利用斑点杂交进行阳性克隆的第一次筛选。与未接种根相比, 选择那些在接种根中的表达强度明显提高(至少 3 倍)的克隆进行测序并分析, 结果得到了 57 个不同的 cDNA 克隆(表 1)。核苷酸序列的 BLAST 分析表明, 其中一些片段与已报道的结瘤素基因之间存在着一定的同源性, 如早期结瘤素基因 *ENOD2*, 晚期结瘤素基因 *nodulin-26* 以及豆血红蛋白基因; 3 个片段编码紫云英天冬酰胺合成酶基因; 还有一些片段与某些代谢或水解酶有不同程度的序列相似性。另外, 有 30 个片段没有找到同源基因。

### 2.2 Virtual Northern blot 结果分析及目的基因的克隆

通过 virtual Northern blot, 我们证实了两个只在接种根中表达的代表克隆(图 1)。利用 5' 及 3'-RACE 方法, 获得了它们的全长 cDNA 序列, 分别命名为 *AsG2511* (GenBank 登录号: DQ199644) 和 *As C259* (GenBank 登录号: DQ199642)。

### 2.3 目的基因的序列分析

序列分析表明, *As C259* 编码的多肽含 134 个氨基酸, N-端包含一个由 24 个氨基酸组成的信号肽。除

表 1 紫云英差异表达 cDNA 克隆的序列分析

名称	数量	长度/bp	Blast 搜索到的第一个同源序列	GenBank 登录号	E 值
B9241-6	6	348~419	蚕豆豆血红蛋白 K mRNA	Z54158	$6 \times 10^{-45}$
F124	1	229	紫花苜蓿豆血红蛋白 mRNA	X13375	$3 \times 10^{-15}$
G724	1	229	紫花苜蓿(依洛魁栽培种)豆血红蛋白(MsLb3)基因	M91077	$6 \times 10^{-16}$
B10251-8	8	185~938	紫花苜蓿豆血红蛋白(pNL549) mRNA	X14311	$2 \times 10^{-43}$
C724	1	374	大豆 2-on-2 血红蛋白(GLB3) mRNA	AY547292	$3 \times 10^{-25}$
A2241-2	2	396	紫云英天冬酰胺合成酶 AsAS2 mRNA	AB035248	0.0
B1224	1	474	紫云英天冬酰胺合成酶 AsAS1 mRNA	AB035247	0.0
E824	1	394	豌豆早期结瘤素蛋白(ENOD2) mRNA	X51987	$1 \times 10^{-5}$
G1024	1	577	大豆结瘤素-26 mRNA	X04782	$3 \times 10^{-66}$
C924	1	658	田菁磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因( <i>pepc</i> )	AJ286750	0.0
D324	1	444	推测的辣椒 Cys 蛋白酶 mRNA	AF242733	$2 \times 10^{-4}$
IA725	1	620	羽扇豆二磷酸核苷酸磷酸酶 1 基因( <i>ppd1</i> )	AJ421009	$2 \times 10^{-86}$
D724	1	925	推测的拟南芥 RNA 解旋酶 mRNA (At2g47250)	NM_130293	$2 \times 10^{-43}$
IIB1025	1	322	苜蓿 mth2-10i23 克隆序列	AC140032	$2 \times 10^{-41}$
A424	1	321	无显著匹配序列		
C1124	1	376	无显著匹配序列		
G1124	1	332	无显著匹配序列		
A725	1	340	无显著匹配序列		
D525	1	634	无显著匹配序列		
E624	1	375	无显著匹配序列		
F925	1	290	无显著匹配序列		
G7251-2	2	245~265	无显著匹配序列		
G10251-4	4	458~466	无显著匹配序列		
G1125	1	291	无显著匹配序列		
IB925	1	395	无显著匹配序列		
IC825	1	311	无显著匹配序列		
IE4251-4	4	534~939	无显著匹配序列		
IIA5251-2	2	309	无显著匹配序列		
IIC9251-2	2	210~603	无显著匹配序列		
IIC12251-6	6	258~352	无显著匹配序列		

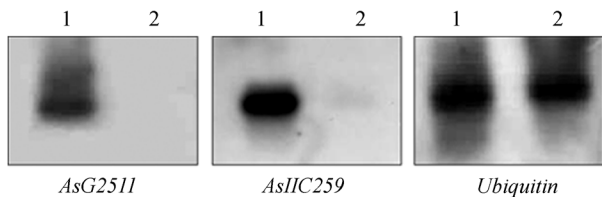


图 1 *AsG251I* 和 *As C259* 的 Virtual Northern blot 分析 1, 接种后 21~26 d 的根; 2, 播种后 27~32 d 的未接种根. *Ubiquitin* 为阳性对照

去信号肽后的多肽分子量为 12 kD, 等电点(pI)为 4.67. PROSITE分析结果显示, *As C259* 多肽链包含了 2 个 N-糖基化位点(51~54: NITS; 113~116: NLSN)、

一个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 (108~110: KKTS) 以及一个酪蛋白激酶磷酸化位点 (54~57: SDVD). BlastP 同源搜索表明, *As C259* 与 LIDD4A9 仅在 N-端的 74 个氨基酸中表现出 35% 的同源性, 后者是一个自羽扇豆的根瘤中分离到的未知功能的结瘤素, LIDD4A9 在接种后 13 d 左右表达, 类似于豆血红蛋白基因 [17]. InterProScan 和 Pfam 数据库查询结果揭示, *As C259* 的 N-端有一个跨膜结构域, 而 C-端则和富含甘氨酸的蛋白质家族在结构上可能存在一定的匹配 (E 值在 cutoff 之上). 这个蛋白质家族包括了晚期结瘤素 16 和 24 以及那些因不同的压力诱



导而产生的蛋白质。

AsG2511 编码一个含 58 个氨基酸的短肽, 其信号肽部分包含 23 个氨基酸. 成熟的多肽分子量为 4 kD, 等电点为 5.16. AsG2511 的二级结构预测显示, 在两段  $\alpha$ -螺旋之间分布着一段 $\beta$ -折叠(数据未展示). 数据库查询没有发现任何相似序列, 也没有找到任何结构域特征.

### 2.4 基因表达分析

为了分析基因的表达情况, 从一套与 SSH 同样生长条件下新培养的接种和未接种植物中提取 RNA, 在完成基因组 DNA 的去除与检测后进行半定量 RT-PCR. *AsG2511* 和 *As C259* 在植物不同生长期、不同器官中 RNA 的相对积累如图 2 和 3 所示. 由图可见, 所有能检测到目的基因的样品中均只扩增出

了一条大小一致、符合预期大小的带. 为了弄清基因的诱导是由于共生侵染引起, 还是植物幼根本身的生长发育所致, 我们还分别提取了 4 及 6 天龄未接种根的 RNA, 并做了同样的 RT-PCR 分析. 结果显示, 这两个基因在未接种根中没有得到扩增产物, 表明这些基因是侵染特异性诱导(图 2). 紫云英豆血红蛋白基因 *AsB2510*(GenBank 登录号: DQ199647)作为有效根瘤的一个共生标记物也被同时分析. 由图 2(b)可以看出, *AsB2510* 在接种后 5 d 左右开始表达. *AsG2511* 在接种后 9 d 左右开始转录, *As C259* 在接种后 7 d 左右即可检测到它的表达, 接种后 9 d 其转录水平显著上升( $P<0.05$ , 图 2). *AsG2511* 和 *As C259* 在根瘤中的表达水平都非常高, 在除去根瘤的接种根中也有表达, 但表达水平明显下降( $P<0.05$ , 图 3). 叶片

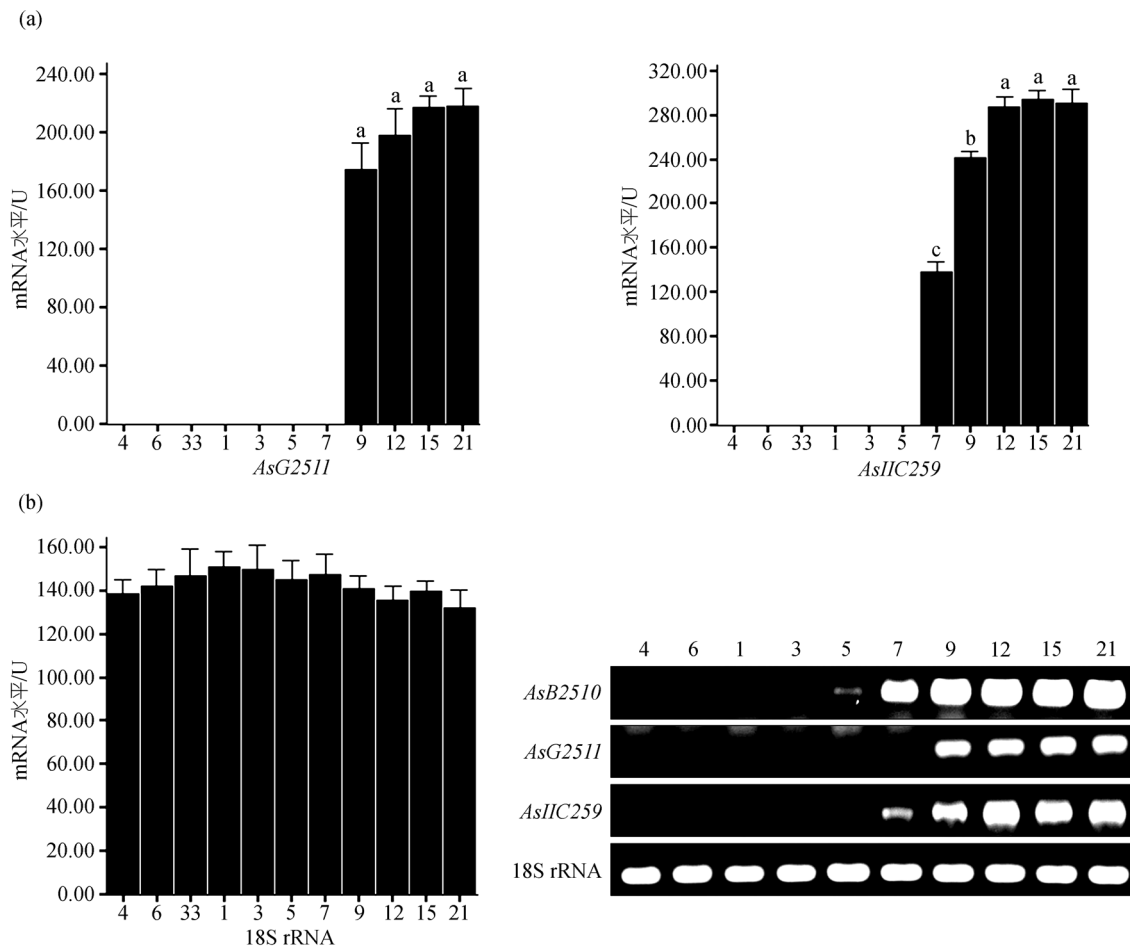


图2 *AsG2511* 和 *As C259* 在植物不同生长天数时的表达分析

图中数字表示总 RNA 来自: 4, 4 天龄的未接种根; 6, 6 天龄的未接种根(刚好于接种前收获); 33, 33 天龄的未接种根; 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 21 分别代表接种后 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 21 d 的根. 18S rRNA 为阳性对照. (a) 半定量 RT-PCR 结果统计分析. 数据为平均值±标准误差, n = 4. mRNA 水平以其电泳条带的强度表示, 纵坐标上的数字为 1000 的倍数. 柱形图上的小写字母表示不同的显著性( $P < 0.05$ ). (b) *AsG2511* 和 *As C259* 的 RT-PCR 分析. 紫云英豆血红蛋白基因 *AsB2510* 作为有效根瘤的一个共生标记物也被同时分析

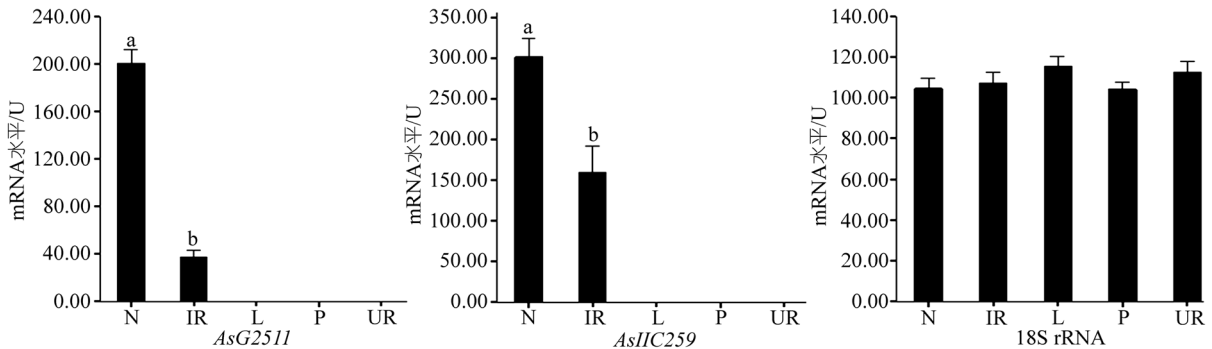


图3 *AsG2511*和*AsC259*在植物不同器官中的表达分析

用于RT-PCR的总RNA来自: UR, 33天龄的未接种根; P, 接种后27 d的叶柄; L, 接种后27 d的叶; IR, 接种后27 d去掉根瘤的根; N, 接种后27 d的根瘤. 18S rRNA为阳性对照. 数据为平均值±标准误差,  $n = 3$ . mRNA水平以其电泳条带的强度表示纵坐标上的数字为1000的倍数. 柱形图上的小写字母表示不同的显著性( $P < 0.05$ )

和叶柄中没有扩增出产物. 18S rRNA 被作为阳性对照, 以便确定所有受检样品在反转录及 PCR 过程中是否等量(图 2 和 3).

### 3 讨论

通过抑制差减杂交, 我们比较了紫云英接种根与未接种根在转录水平上的差异, 得到了 57 个在接种根中表达增强或特异的cDNA克隆. 其中, *AsC259*和*AsG2511* 的全长cDNA序列已利用RACE的方法获得. Virtual Northern blot分析表明, 这两个基因均为结瘤特异性表达. 另外, RT-PCR结果显示, *AsC259*和*AsG2511* 的表达比紫云英豆血红蛋白基因晚 2~4 d, 根据Nap和Bisseling<sup>[3]</sup>的定义, 它们可被归为晚期结瘤素基因.

与LIDD4A9相似, *AsC259*多肽链的N-端也含有疏水性的信号肽. PROSITE数据库查询结果揭示, *AsC259* 编码的蛋白质序列上具有 2 个N-糖基化位点、一个依赖于PKA和PKG磷酸化位点以及一个CK2磷酸化位点. N-糖基化通常是一个共翻译过程, 发生在新生蛋白向内质网(ER)的转移过程中. 当新生肽进入ER并被识别后, 多萜醇酯携带着的寡聚糖前体  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  即转移到新生蛋白上, 受体基团是位于Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa是除Pro以外的任何氨基酸)序列上的Asn残基<sup>[18]</sup>. 在植物中, N-联接聚糖对于糖蛋白的构象、稳定性及生物活性都有着重要的影响. 甚至, N-连接寡糖还可能包含着靶向作用信息, 直接影响着蛋白质识别或细胞间黏着过程<sup>[19]</sup>. 在巨噬细胞吞噬小体的蛋白质组学研究中, 检测到了许多ER和高尔基体蛋白<sup>[20]</sup>. 与植物体系共生体的形成类似, 这些动物细胞中的细胞器也是通过内摄作用形成的.

已在大豆<sup>[21]</sup>、豌豆<sup>[22]</sup>、百脉根<sup>[23]</sup>和苜蓿<sup>[24]</sup>的共生体膜(PBM)中发现了来自内膜系统的蛋白质. 因此, *AsC259* 可能是从ER中分泌, 参与了共生体的形成.

在真核细胞中, 蛋白质的可逆磷酸化是实现细胞基本功能的一个主要调控机制. 作为蛋白质磷酸化酶之一的CK2 影响着众多的生命过程, 如有丝分裂、细胞生长、转录、翻译、DNA复制和信号传导等<sup>[25-27]</sup>. PKA, PKG和蛋白激酶C (PKC)统称为AGC激酶, 在动物细胞中它们是PDK1 的主要作用对象<sup>[28]</sup>. PKA磷酸化产物控制着细胞的多种功能, 包括运动、代谢、分化、突触传递、离子通道活性、生长和等位基因转录等. 实际上, 许多植物蛋白可以被哺乳动物的PKA磷酸化, 并进一步影响它们的功能, 如植物色素<sup>[29]</sup>、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶<sup>[30]</sup>、磷酸蔗糖合成酶<sup>[31]</sup>. 综上所述, 我们推测, 在根瘤形成和发育过程中, *AsC259* 可能参与了根瘤的器官发生或信号传导. 另外, *AsC259*和*AsG2511* 编码的多肽链没有表现出与任何已知序列具有显著同源性的事实表明, 它们可能是结瘤特异性蛋白. 在以后的研究中, 我们将对*AsC259* 的蛋白激酶磷酸化位点加以证实, 并对*AsC259*和*AsG2511* 这两个新的结瘤素基因在根瘤形成过程中的真正功能进行深入研究.

### 参 考 文 献

- 1 Long S R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. Plant Cell, 1996, 8: 1885—1898[DOI]
- 2 van Kammen A. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. Plant Mol Biol Rep, 1984, 2: 43—45
- 3 Nap J P, Bisseling T. Developmental biology of a plantprokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science, 1990, 250: 948—

- 954[DOI]
- 4 Vasse J, de Billy F, Camut S, et al. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4295—4306
  - 5 Brewin N J. Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol*, 1991, 7: 191—226[DOI]
  - 6 Hirsch A M. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 1992, 122: 211—237[DOI]
  - 7 Chen W X, Li G S, Qi Y L, et al. *Rhizobium huakuii* sp. Nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int J System Bacteriol*, 1991, 41: 275—280
  - 8 Malek W, Inaba M, Ono H, et al. Competition for *Astragalus sinicus* root nodule infection between its native microsymbiont *Rhizobium huakuii* bv. *Renge* B3 and *Rhizobium* sp. ACMP18 strain, specific for *Astragalus cicer*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 261—265[DOI]
  - 9 Fujie M, Nakanishi Y, Murooka Y, et al. *AsNODc22*, a novel nodulin gene of *Astragalus sinicus*, encodes a protein that localizes along the cell wall of bacteria induced cells in a nodule. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39: 846—852
  - 10 Naito Y, Fujie M, Usami S, et al. The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *Rengei*. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1087—1095[DOI]
  - 11 Chou M X, Wei X Y, Chen D S, et al. Thirteen nodule-specific or nodule-enhanced genes encoding products homologous to cysteine cluster proteins or plant lipid transfer proteins are identified in *Astragalus sinicus* L. by suppressive subtractive hybridization. *J Exp Bot*, 2006, 57: 2673—2685[DOI]
  - 12 Chou M X, Wei X Y, Chen D S, et al. A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 764—772[DOI]
  - 13 Fåhræus G. The infection of white clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique. *J Gen Microbiol*, 1957, 16: 374—381
  - 14 Madsen E B, Madsen L H, Radutoiu S, et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 2003, 425: 637—640[DOI]
  - 15 Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Res Sym Ser*, 1999, 41: 95—98
  - 16 McGuffin L J, Bryson K, Jones D T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 2000, 16: 404—405[DOI]
  - 17 Swiderski M R, Zaborowska Z, Legocki A B. Identification of new nodulin cDNAs from yellow lupine by differential display. *Plant Science*, 2000, 151: 75—83[DOI]
  - 18 Ceriotti A, Duranti M, Bollini R. Effects of N-glycosylation on the folding and structure of plant proteins. *J Exp Bot*, 1998, 49: 1091—1103[DOI]
  - 19 Rayon C, Lerouge P, Laboratoire L F. The protein N-glycosylation in plants. *J Exp Bot*, 1998, 49: 1463—1472[DOI]
  - 20 Garin J, Diez R, Kieffer S, et al. The phagosome proteome: Insight into phagosome functions. *J Cell Biol*, 2001, 152: 165—180[DOI]
  - 21 Panter S, Thomson R, de Bruxelles G, et al. Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13: 325—333[DOI]
  - 22 Saalbach G, Erik P, Wienkoop S. Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics*, 2002, 2: 325—337[DOI]
  - 23 Wienkoop S, Saalbach G. Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1080—1090[DOI]
  - 24 Catalano C M, Lane W S, Sherrier D J. Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules. *Electrophoresis*, 2004, 25: 519—531[DOI]
  - 25 Yu S, Wang H, Davis A, et al. Consequences of CK2 signalling to the nuclear matrix. *Mol Cell Biochem*, 2001, 227: 67—71 [DOI]
  - 26 Tuteja N, Reddy M K, Mudgil Y, et al. Pea DNA topoisomerase I is phosphorylated and stimulated by casein kinase 2 and protein kinase C. *Plant Physiol*, 2003, 132: 2108—2115 [DOI]
  - 27 Samaniego R, Jeong S Y, de la Torre C, et al. CK2 phosphorylation weakens 90 kDa MFP1 association to the nuclear matrix in *Allium cepa*. *J Exp Bot*, 2006, 57: 113—124[DOI]
  - 28 Storz P, Toker A. 3'-Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci*, 2002, 7: d886—902[DOI]
  - 29 Wong Y S, Cheng H C, Walsh D A, et al. Phosphorylation of *Avena* phytochrome *in vitro* as a probe of light-induced conformational changes. *J Biol Chem*, 1986, 261: 13321—13328
  - 30 Terada K, Kai T, Okuno S, et al. Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Phosphorylation of Ser<sup>15</sup> with a mammalian cyclic AMP-dependent Protein kinase diminishes sensitivity to inhibition by malate. *FEBS Lett*, 1990, 259: 241—244[DOI]
  - 31 Huber S C, Huber J L. Regulation of maize leaf sucrosephosphate synthase by protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32: 91—97