

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55(7):843–850; 4 July 2015  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140575

## *katG* 基因在豌豆根瘤菌抗氧化中的功能

周艳琳, 何冬兰, 李晓华, 曾小波, 田梦洋, 程国军\*

中南民族大学生命科学院, 湖北 武汉 430074

**摘要:**【目的】细菌中过氧化物/过氧化氢酶 KatG 参与活性氧(ROS)的解毒过程,从而防止其对细菌生长伤害,本文研究根瘤菌中 *katG* 基因的抗氧化功能对豌豆根瘤菌 3841 生长及共生固氮的影响。【方法】通过基因敲除、遗传互补和对菌株的抗氧化和共生能力分析,系统地探究了根瘤菌中 *katG* 基因的功能。【结果】*katG* 基因突变不影响菌株在自生培养条件下生长状况,但 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 短时间处理导致突变株的存活率显著下降。实时荧光定量 RT-PCR 结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不能诱导豌豆根瘤菌 3841*katG* 基因的表达。进一步研究发现突变体中 *katG* 基因缺失能显著提高抗氧化基因 *ohrB* 的表达,而降低 *grxC* 基因的表达。植物盆栽实验发现,*katG* 突变虽然对根瘤菌共生固氮能力和竞争结瘤能力均无影响,但 *katG* 在类菌体中表达显著下调。同时,*katG* 突变显著影响了根瘤菌在植物根圈中的定殖能力。【结论】研究表明 *katG* 虽对豌豆根瘤菌自生和共生固氮无明显影响,但在抗氧化和根圈定殖中起重要作用,外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 *katG* 的表达无诱导作用,但 *katG* 调节 *ohrB* 和 *grxC* 等抗氧化基因的表达,从而在抗氧化和共生中发挥作用。

**关键词:** 豌豆根瘤菌, *katG* 基因, 实时荧光定量 RT-PCR, 抗氧化功能, 共生固氮

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0843-08

生物体中由生理代谢和环境胁迫产生的活性氧(ROS)包括超氧阴离子,羟基自由基和过氧化氢。在氧化胁迫初期由于抗氧化系统的存在,低浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可作为信号分子调节不同的代谢反应;但当其积累量超出清除系统的清除能力时,导致细胞氧化伤害<sup>[1]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够穿透膜结构而与胞内的铁离子通过 Fenton 反应产生最具有毒性作用的羟基自由基 HO·<sup>[2]</sup>,同时将会破坏膜脂结构、蛋白质和核酸等,从而导致细胞凋亡。

在根瘤菌固氮期间,固氮酶起着重要作用。但

由于固氮酶遇到氧气失活,因此需要一个氧压较低的环境,铁氧还蛋白、尿酸酶、豆血红蛋白等参与创造这种低氧压环境<sup>[3]</sup>。根瘤内的血红蛋白作为氧的一种载体缓冲细胞环境,防止氧浓度大幅度变化,宿主细胞间质中的抗坏血酸盐作为重要的中间介质调整各种生理条件,而清除过氧化物则可能由过氧化物酶完成<sup>[4]</sup>。

微生物体内有一套复杂地抗氧化系统来清除体内过多的自由基。过氧化氢酶又称触酶,是抗氧化酶系统中的一种,能够将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 催化生成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>

**基金项目:**湖北省自然科学基金项目(2014CFB914);中南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金自科重点项目(CZZ12005, CZW14001)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-27-67842689; E-mail:chengguojun@mail.scuec.edu.cn

**作者简介:**周艳琳(1990-),女,湖北黄冈人,硕士研究生,主要从事微生物学研究。E-mail:zhouyulin163@163.com

**收稿日期:**2014-12-02; **修回日期:**2015-01-29

从而解除其毒性。过氧化氢酶通常有两种:具有过氧化物和过氧化氢双功能的酶 HP I 和具有过氧化氢单功能的酶 HP II, 它们都含有血红素, 此外在一些细菌中也发现了不含血红素而含锰的过氧化氢酶<sup>[5]</sup>。在 *E. coli* 中, *katG* 和 *katE* 分别编码 HP I 和 HP II 两种酶<sup>[6-7]</sup>, 在较低浓度  $H_2O_2$  下, *katG* 在对数期可被 OxyR 激活, 而 *katE* 也能被激活, 但需要的是对数期的  $\sigma$  因子 RpoS<sup>[24]</sup>。在苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 中发现 *katA* 基因编码的过氧化氢酶 KatA 受  $H_2O_2$  诱导, 并且是降解  $H_2O_2$  主要的过氧化氢酶, 但对结瘤和固氮并无影响, 另一个过氧化氢酶 KatC 和过氧化氢/过氧化物酶 KatB 在丰富培养基中于稳定期表达<sup>[15]</sup>, *katA* 和 *katC* 双突变以及 *katC* 和 *katB* 双突变都能够显著的影响固氮酶活, 而且侵染结瘤不正常<sup>[16]</sup>。

本研究构建了豌豆根瘤菌 3841 *katG* 基因突变株, 通过自生和共生实验, 研究 *katG* 基因突变对菌株生长和共生固氮能力的影响; 并通过荧光定量 RT-PCR 分析抗氧化相关基因的表达。为阐明 *katG* 基因抗氧化功能和调控机制提供了研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种质粒和培养基:** 豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 3841, 克隆载体 pk19mob 和表达载体 pRK415 均由英国牛津大学 Philip S. Poole 教授提供。甜豌豆和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由实验室保存。LB 培养基<sup>[8]</sup>用于大肠杆菌培养, 豌豆根瘤菌培养用 TY 培养基<sup>[8]</sup>和 AMS 培养基<sup>[9]</sup>。培养根瘤菌所用抗生素: 链霉素 (Str), 新霉素 (Neo)、卡那霉素 (Km) 和四环素 (Tc), 购于 Sigma 公司, 使用浓度为: Str, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Neo, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Tc, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 培养大肠杆菌所用抗生素浓度: Km, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Tc, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I 及 *Kpn* I 等 (TaKaRa 公司); phusion 高保真酶 (Thermo Scientific), *Taq* DNA 聚合酶 (Thermo Scientific), DNA 凝胶回收试剂盒 (博大泰克), T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司), RNAliso Plus (TaKaRa 公司), PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser

(Perfect Real Time), FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), 752 型紫外可见光光度计 (上海光谱仪器有限公司), PCR 仪 (Biometra), 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)。

### 1.2 *katG* 基因插入突变与互补菌株构建

按照 Luo 等方法构建 *katG* 基因突变株<sup>[10]</sup>, 主要步骤为: 以豌豆根瘤菌 3841 总 DNA 为模板, 以 *kat-up/kat-lw* 为引物 (表 1) 扩增目的片段, 将扩增得到的产物与空载体 pK19mob 分别经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切后, T4 连接酶连接过夜, 然后转入感受态 DH5 $\alpha$  中, 克隆子经 PCR 和测序验证后, 获得阳性克隆质粒 pKkatG。以含 pKkatG 质粒的大肠杆菌为供体菌, 3841 为受体菌, 含质粒 pRK2013 的大肠杆菌为辅助菌进行三亲本杂交, 通过抗性筛选及用引物 *kat-map/PK19A* PCR 验证得到缺失突变株 RLkatG。

构建 *katG* 互补菌株: 以豌豆根瘤菌 3841 总 DNA 为模板, 以 *kat-1F/kat-1R* 为引物扩增得到目的片段 (表 1)。将扩增得到的产物与根瘤菌表达载体 pRK415 分别经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后, 利用 T4 连接酶连接过夜, 然后转入感受态 DH5 $\alpha$  中, 经 PCR 和测序验证后, 获得阳性克隆质粒 pRKkatG。然后以含 pRKkatG 质粒的大肠杆菌为供体菌, 根瘤菌 RLkatG 为受体菌, 含质粒 pRK2013 的大肠杆菌为辅助菌进行三亲本杂交, 经抗性筛选及用引物 M13F/M13R PCR 验证, 获得回复突变菌株 RLkatG (pRKkatG)。

### 1.3 菌株生长

**1.3.1 菌株培养:** 将已活化的突变株 RLkatG 和野生株 3841 经 AMS 洗脱后, 接种于 50 mL 的 AMS 培养基中, 使初始  $OD_{600}$  为 0.01, 每个菌 3 个重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 于摇床中振荡培养, 每隔一段时间取样, 测  $OD_{600}$  值。

**1.3.2 抑菌实验:** 将培养至对数期 ( $OD_{600} = 0.4$ ) 的待测菌株经生理盐水清洗并重新溶解后, 涂布于 AMS 琼脂平板, 待平板晾干后, 将浸有不同浓度  $H_2O_2$  的圆滤纸片放置在平板中央, 每个平板 1 个圆滤纸片, 每种浓度 3 个重复。20 h 后测量抑菌圈的直径。

**1.3.3  $H_2O_2$  抑菌曲线测定:** 分别收集对数期 ( $OD_{600} = 0.4$ ) 的突变株 RLkatG 和野生株 3841 菌液 20 mL, 用生理盐水清洗后, 分成 4 等份, 然后分别用

0、0.1、0.5 和 1 mmol/L 的  $H_2O_2$  5 mL 于 28℃ 处理 1 h, 用生理盐水洗涤去除  $H_2O_2$  后, 稀释涂平板, 每种

浓度 3 个重复。倒置于 28℃ 培养箱中培养 3 d, 计算菌落数。

表 1. PCR 所用引物

Table 1. Primers used in the PCR

Primer	Description	Sequence(5'→3')*
kat-up	Sense primer for <i>katG</i> mutation	TTT <u>T</u> CTAGATCTCTCTGGGCTGACCTGTTG
kat-lw	Antisense primer for <i>katG</i> mutation	TTA <u>A</u> AGCTTTTCGAAGAAGTAGTTGCTCCA
kat-map	Mapping PCR primer for <i>katG</i> mutation	AGACCGGATCGAAACGCAGC
pK19A	pK19mob mapping primer	ATCAGATCTTGATCCCTGC
kat-1F	Sense primer for <i>katG</i> complementation	TTT <u>A</u> AGCTTAGTCTTTGATCTGCATTGAC
kat-1R	Antisense primer for <i>katG</i> complementation	AAAGGTACCCAAAATGCTGTCGATCAGACG
M13F	Sense primer for <i>LacZ</i>	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13R	Antisense primer for <i>LacZ</i>	CACACAGGAAACAGCTATGAC
gyrB1-for	Sense primer for qRT-PCR of <i>gyrB1</i>	GGCATCACAAAAGGGAAAA
gyrB1-rev	Antisense primer for qRT-PCR of <i>gyrB1</i>	GCGAGGAGAATTTCCGATCA
QohrB-F	Sense primer for qRT-PCR of <i>ohrB</i>	CGGGCAGGCTGACATTGAGG
QohrB-R	Antisense primer for qRT-PCR of <i>ohrB</i>	GCTGCTCAGAGAAAGATCAC
Qgpx-F	Sense primer for qRT-PCR of <i>gpx</i>	AAACAGTGGATGGTCTGAC
Qgpx-R	Antisense primer for qRT-PCR of <i>gpx</i>	GAGCTTTTCCAATCCCTCAT
Qprx-F	Sense primer for qRT-PCR of <i>prx</i>	CAGTGCTCATTGGGTTGTTT
Qprx-R	Antisense primer for qRT-PCR of <i>prx</i>	CTGTCGATGCCTTTCTCTCTG
QgrxC-F	Sense primer for qRT-PCR of <i>grxC</i>	GAAGAAAAGGCTGTGGAATA
QgrxC-R	Antisense primer for qRT-PCR of <i>grxC</i>	AGATCTGCGGAAAAGTGGTA

\* Restriction sites in primer sequences are underlined.

#### 1.4 qRT-PCR 分析相关抗氧化基因的表达量

进行细菌 RNA 提取时, 接种已活化的突变株 RLkatG 和野生型 3841 于 AMS 液体培养基中, 使得初始  $OD_{600}$  为 0.01, 每种菌 3 个重复, 28℃、200 r/min 于摇床中振荡培养至  $OD_{600}$  在 0.3 至 0.6 之间, 菌体离心收集后用生理盐水或 0.5 mmol/L  $H_2O_2$  处理 1 h, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 然后利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒将其反转录成 cDNA, 用相关抗氧化基因的 PCR 引物和 *gyrB1* 内参基因的引物(表 1), 对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR。

进行类菌体 RNA 提取时, 从培养 25 d 的豌豆植株摘取根瘤置于预冷的研钵中, 在液氮中研磨至粉状。每 100 mg 根瘤加入 1 mL Trizol, 其后续 RNA 提取、cDNA 制备等步骤与细菌 RNA 提取相同。以 AMS 培养至对数期( $OD_{600} = 0.4$ )的 3841 菌株为对照, 对类菌体中 *katG* 基因进行荧光定量 PCR 分析。

#### 1.5 植物盆栽实验

按照 Poole 等<sup>[11]</sup>的方法, 采用无菌蛭石盆栽。豌豆种子经表面灭菌催芽处理后, 播种至装

有已灭菌的蛭石塑料烧杯。栽培豌豆用无氮营养液, 播种时每颗豌豆上加 1 mL 相应菌液。一钵 2 颗豌豆, 3 钵重复。盖好保鲜膜后放入光照培养箱中培养。3 周后利用乙炔还原法测量根瘤固氮酶活。

进行竞争结瘤实验时, 首先配置突变株 RLkatG 与野生株 3841 不同比例的混合菌液, 使每 1 mL 菌液中 RLkatG 与 3841 的 CFU 比率分别为  $10^7:10^6$ 、 $10^6:10^7$  和  $10^6:10^6$ 。播种时每颗豌豆上加 1 mL 相应比例的混合菌液。每个处理 3 个重复, 4 周后, 每钵收集根瘤 50 个, 破瘤划线分别接种于含有 TY + Str + Neo 和 TY + Str 平板, 3 d 后统计, 计算突变株的占瘤率。

进行根圈定殖实验时, 按照 Karunakaran 等的方法<sup>[25]</sup>, 配置突变株 RLkatG 与野生株 3841 不同比例的混合菌液, 使每 1 mL 中 3841 与 RLkatG 的 CFU 比率分别为  $10^3:0$ 、 $0:10^3$ 、 $10^3:10^3$  和  $10^3:10^4$ 。分别接种至已培养 7 d 的豌豆植株中。接种 7 d 后, 每管加 20 mL PBS 缓冲液, 并剧烈振荡 30 min, 菌悬液经稀释后, 涂布于 TY + Str + Neo 和 TY + Str 平板。培养 3 d 后统计数据。

## 2 结果和分析

### 2.1 豌豆根瘤菌 3841 *katG* 基因突变体和回复菌株的构建

按照 Karunakaran 等<sup>[12]</sup> 构建突变体的方法, 利用 *kat-map/pK19A* 对 *katG* 突变株进行 PCR 验证, 成功扩增出 1 kb 左右的目标片段, 获得 *katG* 基因突变株 RLkatG。

在构建 3841 *katG* 回复突变体时, 将 pRK*katG* 质粒通过三亲本接合, 转入上述突变株 RLkatG 中, 然后利用 M13F/M13R 进行 PCR 验证, 成功扩增出 2.7 kb 左右片段, 获得回复菌株 RLkatG (pRK*katG*)。

### 2.2 豌豆根瘤菌 *katG* 突变株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感

**2.2.1 *katG* 基因突变不影响菌株正常生长:** 将 RLkatG 和 3841 分别接种于 AMS 培养基培养, 使初始 OD<sub>600</sub> = 0.01, 每隔一段时间测其 OD<sub>600</sub>, 绘制出其生长曲线图, 图 1 所示, RLkatG 生长状况与野生型 3841 类似, 表明 *katG* 基因对豌豆根瘤菌 3841 正常生长无明显影响。

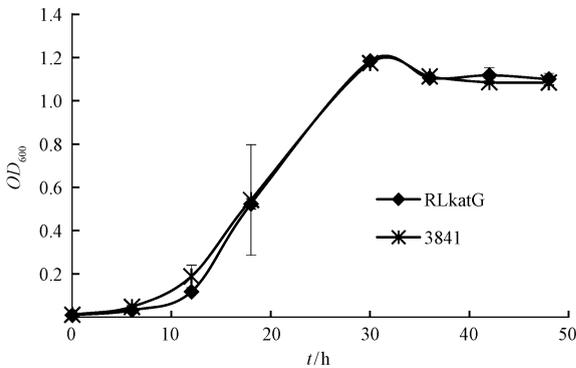


图 1. 自生条件下 3841 和 RLkatG 的生长情况

Figure 1. The growth of 3841 and RLkatG in free-living condition.

**2.2.2 *katG* 基因突变使菌株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感:** 抑菌圈实验检测不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度下 3841、RLkatG 和回复突变菌株 RLkatG (pRK*katG*) 的抑菌圈直径 (表 2)。20 h 时, 当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度分别在 20 mmol/L 和 200 mmol/L 时, 与对照 3841 相比, RLkatG 抑菌圈直径最大并且有显著性差异。而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 *katG* 基因的互补菌株 RLkatG (pRK*katG*) 抑菌圈很小, 这表明互补菌株中多拷贝 *katG* 基因成功恢复了 *katG* 突变菌株的抗氧化能力。

表 2. 不同双氧水浓度下抑菌圈大小

Table 2. The diameter of inhibition zone in different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/ (mmol/L)	Diameter/cm		
	3841	RLkatG	RLkatG (pRK <i>katG</i> )
20	1.2 ± 0.3	1.8 ± 0.2*	0.7 ± 0.2
200	2.8 ± 0.1	3.5 ± 0.1*	2.3 ± 0.3

\* Shows significant different level compared to the wild type Rlv3841 and RLkatG (pRK*katG*),  $P < 0.05$ .

为进一步检测不同浓度双氧水对 *katG* 突变菌株生长的影响, 将对数期的菌株经不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 计算菌株的存活率, 绘制出双氧水抑菌曲线 (图 2)。经不同浓度双氧水处理后, 菌株生长均受到一定程度的影响, 但 RLkatG 敏感性更强。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度小于 0.1 mmol/L 时, 3841 和 RLkatG 菌落数均有所升高。有研究发现: 低浓度情况下, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将作为一种信号分子, 增强生物体抵御外界环境胁迫的能力<sup>[13]</sup>。用 0.1 - 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理菌株时, 野生型 3841 菌落数增加, 而 RLkatG 菌落数随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度增加而下降, 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时, 两者菌落数相差最大。

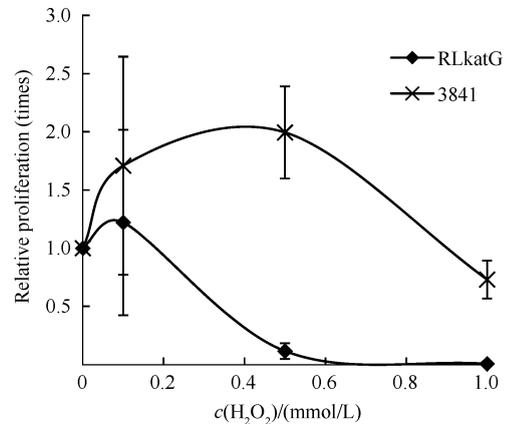


图 2. 不同浓度双氧水对菌体生长的影响

Figure 2. Growth of Rlv3841 and RLkatG in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The cell density values were normalized to that obtained for a control culture without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition.

### 2.3 荧光定量 RT-PCR 分析抗氧化相关基因的表达量

RT-PCR 后, 将所得到的数据用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 进行处理。与用生理盐水处理的 3841 对照组相比, 用 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 3841 中 *katG* 表达量为 1.401 倍, 提高不显著。然而, 用 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理

3841 和 RLkatG 时,突变体 RLkatG 中 *ohrB* 表达量显著提高,是 3841 的 12.7 倍,*grxC* 表达量则显著下降,仅为 3841 的 0.32 倍,其他抗氧化基因表达变化均不明显(图 3)。另外,*katG* 在根瘤类菌体中表达量仅为在自生条件下的  $0.39 \pm 0.09$  倍,表明 *katG* 基因在共生根瘤中表达显著下调。

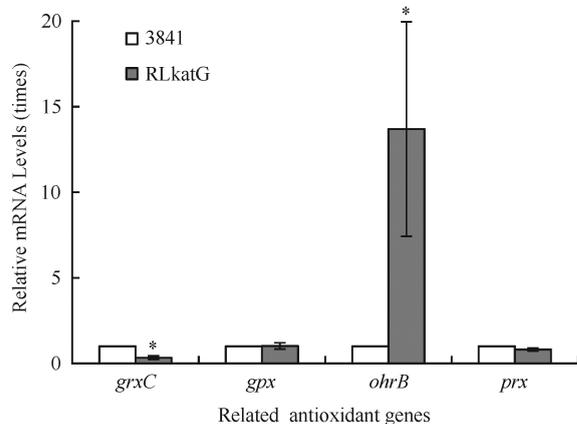


图 3.  $H_2O_2$  条件下抗氧化基因相对表达量

Figure 3. The expression of antioxidative genes in 3841 and RLkatG upon a treatment of  $H_2O_2$ . *grxC*: glutaredoxinC; *gpx*: glutathione peroxidase; *ohrB*: organic hydroperoxide; *prx*: peroxiredoxin.

## 2.4 植物盆栽实验

盆栽 3 周后,突变株 RLkatG 接种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固氮酶活。结果发现 3841、RLkatG 和 RLkatG (pRKkatG) 三者所接种的植株其固氮酶活并无显著性差异,说明 *katG* 基因突变根瘤固氮能力无明显影响(图 4)。

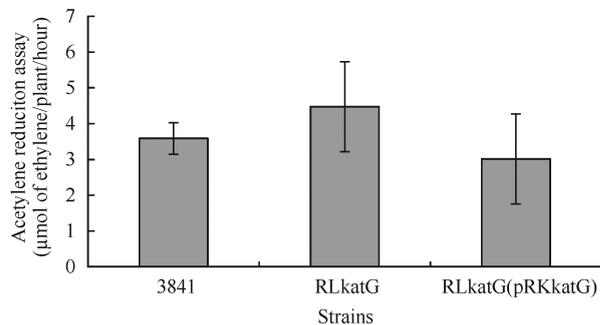


图 4. 野生型 3841, 突变菌株 RLkatG 和插入突变株 RLkatG (pRKkatG) 的共生固氮酶活

Figure 4. The symbiotic nitrogenase activity of Rlv 3841, RLkatG and RLkatG (pRKkatG).

在竞争结瘤实验中,观察根瘤的生长情况,若在 TY + Str + Neo 上长出,说明该菌为突变株 RLkatG。结果表明:当 3841 和 RLkatG 接种浓度的比例分别为  $10^7:10^6$ 、 $10^7:10^7$  和  $10^6:10^7$  时,RLkatG 的占瘤率分别为 40%、52% 和 68%。其中当 3841 和 RLkatG 接种浓度相同时,两者占瘤率相近,且 RLkatG 占瘤率随着 RLkatG 浓度增加而增加,表明 *katG* 突变不影响根瘤菌竞争结瘤能力。

## 2.5 植物根圈定殖实验

为进一步研究根瘤菌 *katG* 基因在豆科植物根圈定殖中的功能,将 3841 和 RLkatG 以不同浓度比例接种于豌豆植株根部,结果发现:当 3841 和 RLkatG 以相同浓度分别接种时,3841 的菌株在根圈中的数量是突变株的 2.3 倍;当以相同浓度比例混合接种时,3841 的数量是 RLkatG 的 2.7 倍,并且 RLkatG 数量与单独接种时相近;同时当 RLkatG 的接种浓度是 3841 的 10 倍时,3841 的数量是 RLkatG 的 0.5 倍(图 5)。表明 *katG* 突变严重影响根瘤菌在植物根圈中的定殖能力。

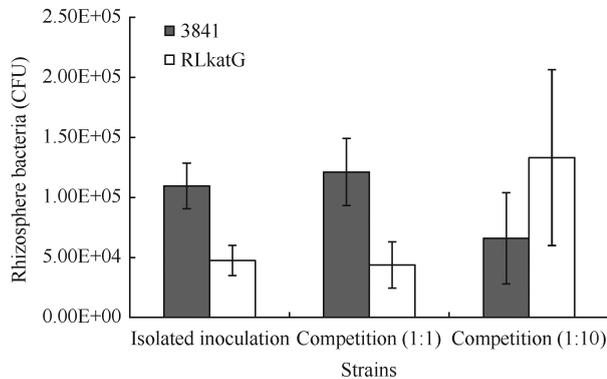


图 5. 野生型根瘤菌 3841 和突变株 RLkatG 定殖情况

Figure 5. Rhizosphere colonization levels of the wild type 3841 and the mutant RLkatG.

## 3 讨论

过氧化氢酶在生物体中的主要作用是分解细胞内的过氧化氢。细胞正常的生理代谢会产生如  $H_2O_2$  等过氧化物,过量的过氧化物会损害脂质、蛋白质及 DNA,同时与细胞的衰老有关。本研究发现 *katG* 突变对豌豆根瘤菌 3841 正常条件下生长无影响,但对  $H_2O_2$  十分敏感。用不同浓度  $H_2O_2$  处理对数期的突变型与野生型根瘤菌时,在低浓度  $H_2O_2$

条件下,根瘤菌生长有一定程度的增加,这是由于低浓度  $H_2O_2$  作为一种信号分子促进根瘤菌生长<sup>[13-14]</sup>;但随着  $H_2O_2$  浓度的增大,菌株的生长受到抑制,其中  $H_2O_2$  浓度达到 0.5 mmol/L 时,突变菌株 RLkatG 最敏感;而当双氧水浓度过大时,根瘤菌逐渐死亡,这说明处于对数期菌株中的 *katG* 基因在双氧水解毒过程中的作用是其他抗氧化基因所无法弥补的。

本实验发现,经  $H_2O_2$  处理的野生型菌株中 *katG* 表达量提高到 1.401 倍,但没有达到 2 倍的显著水平,说明 *katG* 的表达不受外界  $H_2O_2$  诱导。Jamet 等研究也发现,*S. meliloti* 的 *katB* 基因突变在 batch culture(分批培养)中即自然状态下培养是组成型表达,在氧压力下不被诱导表达<sup>[15-16]</sup>。进一步研究发现,突变体 RLkatG 中编码谷氧还蛋白的基因 *grxC* 表达量显著降低,其表达水平仅为野生型的 1/3,而编码有机过氧化物酶的基因 *ohrB* 则显著提高,其表达水平为野生型的 12.7 倍。在生物体中,Grx、Ohr、Prx 和 Gpx 在抗氧化保护中起重要作用,谷氧还蛋白(Grx)能够还原分子之间的二硫键用以维持细胞内氧化还原态<sup>[17]</sup>;OhrB 是有机过氧化物酶,受  $\sigma^B$  调控<sup>[18]</sup>;过氧化物氧还蛋白(Prx)是一种过氧化物酶,能将 ROOH(过氧化物过氧基)还原成 ROH,还可通过调节蛋白激酶的氧化还原态来调控细胞信号转导通路<sup>[19]</sup>;谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)用以清除脂质过氧化物,也可用于清除  $H_2O_2$ <sup>[20]</sup>。本研究发现 *katG* 虽对 *prx* 和 *gpx* 转录无影响,但正调控 *grxC* 基因表达而负调控 *ohrB* 基因表达。因此推测,*katG* 基因除本身参与根瘤菌抗氧化功能外,还在根瘤菌抗氧化体系中发挥了重要的调控作用。

已有研究表明,*kat* 基因在共生侵染线形成阶段和类菌体中均大量表达<sup>[16-21]</sup>。然而,在本研究中,*katG* 突变不影响根瘤菌 3841 共生固氮能力和竞争结瘤能力。在 *M. loti* MAFF303099 中,*katG* 突变导致根瘤菌生长延迟并对  $H_2O_2$  的敏感性增强,但对根瘤菌结瘤固氮效率无明显影响<sup>[22]</sup>。研究发现,根瘤固氮过程会产生一个高氧压环境<sup>[16]</sup>,豌豆根瘤菌通过降低 *katG* 在类菌体中的表达(表达为自生情况表达的 2/5),从而调控 *grxC*、*ohrB* 等基因,激活其它的抗氧化替代补偿机制<sup>[27]</sup>,从而维持根瘤低氧的固氮环境,这也是 *katG* 基因缺失突变株不影响根瘤菌结瘤和固氮的原因。在 *S. meliloti* Rm1021 中,就发

现了 3 种编码过氧化氢酶的基因,分别为具有单功能团的 *katA* 和 *katC* 基因以及具有双功能团的 *katB* 基因,突变研究发现:三者的单突变体对  $H_2O_2$  都敏感,*katA* 在类菌体中大量表达,且 *katB* 和 *katC* 在根瘤菌侵染阶段表达量显著提高,同时 *katA* 和 *katC* 双突变以及 *katC* 和 *katB* 双突变都能够显著地影响固氮酶活,而且侵染结瘤不正常<sup>[16-23]</sup>。另外,本研究中还发现 *katG* 突变影响根瘤菌 3841 在根圈中的定殖能力,研究表明细菌在入侵植物时会使植物产生活性氧来阻止其入侵<sup>[26]</sup>,因此,根瘤菌中 *katG* 基因在根系抗氧化中发挥了极为重要的作用。而成功的根系定殖与吸附是结瘤的第一步,从而决定了共生的成败<sup>[29]</sup>。

**致谢:**感谢英国牛津大学 Philip S. Poole 教授提供的 *R. leguminosarum* 3841 菌株、pK19mob 和 pRK415 质粒。

## 参考文献

- [1] Hung SH, Yu CW, Lin CH. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2005, 46: 1-10.
- [2] Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 2003, 57(1): 395-418.
- [3] Dalton DA, Post CJ, Langeberg L. Effects of ambient oxygen and of fixed nitrogen on concentrations of glutathione, ascorbate, and associated enzymes in soybean root nodules. *Plant Physiology*, 1991, 96(3): 812-818.
- [4] Dalton DA, Langeberg L, Treneman NC. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiologia Plantarum*, 1993, 87(3): 365-370.
- [5] Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004, 61(2): 192-208.
- [6] Von Ossowski I, Mulvey MR, Leco PA, Borys A, Loewen PC. Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HPII. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 514-520.
- [7] Triggs-Raine BL, Doble BW, Mulvey MR, Sorby PA, Loewen PC. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(9): 4415-4419.

- [ 8 ] Joseph S, David WR. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [ 9 ] Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson JF. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1970, 61(2): 205-218.
- [ 10 ] Luo L, Yao S, Becker A, Rübberg S, Yu GQ, Zhu JB, Cheng HP. Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4562-4572.
- [ 11 ] Poole PS, Blyth A, Reid CJ, Walters K. *myo-Inositol* catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology*, 1994, 140(10): 2787-2795.
- [ 12 ] Karunakaran R, Haag AF, East AK, Ramachandran VK, Prell J, James EK. BacA is essential for bacteroid development in nodules of galeoid, but not phaseoloid, legumes. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(11): 2920-2928.
- [ 13 ] Li S, Xue L, Feng H, Xu S, An N. Hydrogen peroxide signaling and its biological importance in plants. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(10): 804-810. (in Chinese)  
李师翁, 薛林贵, 冯虎元, 徐世建, 安黎哲. 植物中的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 信号及其功能. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(10): 804-810.
- [ 14 ] Wang Y, Li J, Yu Z, Xue F. The signaling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improved the heat-tolerance system of *Festuca arundinacea* by antioxidative activity. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(1): 89-94. (in Chinese)  
王艳, 李建龙, 余醉, 薛峰. 信号分子 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 调节抗氧化系统提高高羊茅耐热性研究. 草业学报, 2010, 19(1): 89-94.
- [ 15 ] Hérouart D, Sigaud S, Moreau S, Frendo P, Touati D, Puppo A. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(23): 6802-6809.
- [ 16 ] Jamet A, Sigaud S, van de Sype G, Puppo A, Hérouart D. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2003, 16(3): 217-225.
- [ 17 ] Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(24): 13963-13966.
- [ 18 ] Zuber P. Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 575-597.
- [ 19 ] Wang W, Qi T, Liu Y, Li Y, Jiang Y. Function and modulation of peroxiredoxin protein. *Chemistry of Life*, 2010(2): 184-188. (in Chinese)  
王蔚, 祁婷婷, 刘芸, 李玉花, 姜勇. 过氧化物氧还蛋白家族的功能及调节机制. 生命的化学, 2010(2): 184-188.
- [ 20 ] Ma S. Progress on GSH-Px and GST. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(10): 53-56. (in Chinese)  
马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(10): 53-56.
- [ 21 ] Jamet A, Mandon K, Puppo A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8741-8745.
- [ 22 ] Hanyu M, Fujimoto H, Tejima K, Saeki K. Functional differences of two distinct catalases in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 under free-living and symbiotic conditions. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(5): 1463-1471.
- [ 23 ] Sigaud S, Becquet V, Frendo P, Puppo A, Hérouart D. Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2634-2639.
- [ 24 ] Mulvey MR, Switala J, Borys A, Loewen P. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(12): 6713-6720.
- [ 25 ] Karunakaran R, Ebert K, Harvey S. Thiamine is synthesized by a salvage pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(18): 6661-6668.
- [ 26 ] Fu A, Luo G, Wang A. Active oxygen species generating in plant defense against pathogens. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2000, 8(1): 63-69. (in Chinese)  
傅爱根, 罗广华. 活性氧在植物抗病反应中的作用. 热带亚热带植物学报, 2000, 8(1): 63-69.
- [ 27 ] Vargas Mdel C, Encarnacion S, Davalos A, Reyes-Perez A, Mora Y. Only one catalase, *katG*, is detectable in *Rhizobium elii*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology*, 2003(5), 149: 1165-1176.

- [28] Hérouart D, Sigaud S, Moreau S, Frendo P, Touati D, Puppo A. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (23), 6802-6809.
- [29] Li Y, Zhou J. Study on root colonization dynamics in four

different soybean Rhizosphere by two recombinant *Rhizobia* strains. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21(6):531-534. (in Chinese)

李友国, 周俊初. 2株重组根瘤菌在4个大豆品种根圈中定殖动态的比较研究. *华中农业大学学报*, 2002, 21(6):531-534.

## Antioxidative function of *katG* gene in *Rhizobium leguminosarum*

Yanlin Zhou, Donglan He, Xiaohua Li, Xiaobo Zeng, Mengyang Tian, Guojun Cheng\*

College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China

**Abstract:** [ **Objective** ] Catalase-peroxidase KatG can protect bacteria from damage of reactive oxygen species. This study investigated the antioxidative function of catalase – peroxidase gene *katG* in *Rhizobium leguminosarum* 3841. [ **Methods** ] *katG* mutant strain of *R. leguminosarum* was constructed by homologous recombination. The wild type, *katG* mutant and complementary strain were challenged by oxidative stress and symbiotic ability. [ **Results** ] Under free – living conditions, the *katG* mutant exhibited no generation time extension. However, cells of the *katG* strain were deficient in consumption of high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and were vulnerable after a quick exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The real-time qRT-PCR results showed that *katG* was expressed independently of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In contrast, the *katG* mutant strain displayed higher expression level of *ohrB* gene and lower expression level of *grxC* than the wild type. With regard to symbiotic capacities with *Pisum sativum*, the *katG* mutant was indistinguishable in root nodule nitrogenase activity and competition nodule ability from the wild type. However, *katG* gene was expressed significantly lower in bacteroids than that in free-living strains. Besides, the colonization of the pea rhizosphere by the *katG* mutant was impaired compared to that of the wild type. [ **Conclusion** ] The deletion of *katG* had no significant effect in 3841 under the free-living and symbiosis condition but was essential in antioxidation and colonization of the pea rhizosphere. Although *katG* could not be induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it still played a central role in antioxidation and symbiotic nitrogen fixation by regulating the antioxidant genes such as *ohrB* and *grxC*.

**Keywords:** *Rhizobium leguminosarum*, *katG* gene, real-time qRT-PCR, antioxidative function, symbiotic nitrogen fixation

(本文责编:王晋芳,李磊)

Supported by the National Science Foundation of Hubei Province of China (2014CFB914) and by the Special Fund for Basic Scientific Research of Central Colleges, South-Central University for Nationalities (CZZ12005, CZW14001)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-67842689; E-mail: chengguojun@mail.scuec.edu.cn

Received: 2 December 2014/Revised: 29 January 2015