

水稻条斑病菌 *gacA* 基因的克隆及功能初析

杨万风, 陈 磊, 刘红霞, 胡白石, 刘凤权*

(南京农业大学 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 根据黄单胞菌 *gacA* 基因的同源性设计简并引物, 采用 PCR 方法从水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*) 中克隆了 *gacA* 同源基因, 命名为 *gacA_{Xooc}*。序列比较显示, 该基因在黄单胞菌中是相对保守的。通过同源重组的方法, 构建了 *gacA_{Xooc}* 的插入突变株。对 0.1% Tryptone 的趋化应答能力检测发现, *gacA* 突变株的趋化能力明显降低, 证明 *gacA* 与 *Xooc* 的趋化性相关。

关键词: 水稻条斑病菌; *gacA* 基因; 突变; 趋化性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)02-0208-05

细菌的感应和调控机制是近年来研究的热点和重点。GacA/GacS 双组份调控系统是广泛存在于革兰氏阴性细菌中感应环境信号进而控制基因表达的调控系统^[1]。GacS 为一跨膜的信号感应蛋白, 它识别胞外信号并通过磷酸基团的形式激活调控蛋白 GacA。被激活后的 GacA 蛋白, 则在转录或转录后水平上全局性调控细菌各种生命活动, 如致病性的变化^[2,3], 次生代谢物的产生^[4,5], 群体感应信号的分泌^[6,7], 胞外酶的分泌^[8]等。在许多病原菌中, 严格需要 GacA/GacS 因子合成毒性因子, GacA 或 GacS 的突变株一般均丧失或降低致病性^[2,3,9,10]。近年来, 已有多个 *gacA/gacS* 基因被克隆, 它们在氨基酸水平上具有很高的同源性, 并且在不同的菌中行使不同的功能。

水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xooc*) 是稻黄单胞菌种下的致病变种之一, 侵染水稻引起细菌性条斑病。它主要在水稻薄壁组织细胞间隙生长, 这和白叶枯病菌在维管束中生长不同。本文依据柑橘溃疡病菌 (*X. axonopodis* pv. *citri*, *Xac*) 和甘蓝黑腐病菌 (*X. campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 的 *gacA* 基因序列, 设计简并引物, 从 *Xooc* 中克隆了 *gacA* 基因, 并进一步分析基因的结构和序列, 同时用同源重组的方式构建 *gacA* 基因的插入突变株, 初步研究了 *gacA* 基因在 *Xooc* 中的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、生长条件和质粒: *Xooc* 菌株 RsGD42 (本实验室保存) 于 Nutrient Agar (NA) 培养基上 28℃ 生长, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 于 Luria-Bertani (LB) 培养液中 37℃ 振荡培养, 相应的固体培养基每升加 15g 琼脂。用于测试 *Xooc* 趋化性的 BH 培养液成份: 每升含 MgSO₄ 0.2g, K₂HPO₄ 1.0g, KH₂PO₄ 1.0g, FeCl₃ 0.05g, NH₄NO₃ 1.0g, CaCl₂ 0.02g, 氨苄青霉素 (Amp) 用量为: *E. coli* 100 μ g/mL, *Xooc* 250 μ g/mL。pMD18-T、pUC18 载体购于 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂和仪器: *Ex Taq* 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA 凝胶回收试剂盒 Ver. 210 DV805A 均购自 TaKaRa 公司; 杂交用地高辛试剂盒购自 Roche 公司; 其他生化试剂均为分析纯。PTC200 PCR 扩增仪 (JM Research), GENE PULSER II 电转化仪均为 BIO-RAD 产品。

1.2 *gacA* 基因的 PCR 扩增和克隆

染色体 DNA 提取、质粒抽提、感受态细胞制备、转化等步骤参照文献 [11] 进行。限制酶酶切、DNA 片段回收及连接、地高辛标记探针及 Southern 杂交按厂商说明书进行。根据 *Xac* 和 *Xcc* 的 *gacA* 序列设计简并引物 (GF: 5'-GCCAGCCGCWAGCGAGGA-3'; GR: 5'-CASCMSGGYASSWGTTC-3') 并扩增 *Xooc* RsGD42 基因组。反应体系 (25 μ L): 2.5 μ L 10 \times buffer,

基金项目: 国家自然科学基金 (30070497), 国家“863 计划” (2002AA245041)

* 通讯作者。Tel: 86-25-84396726; Fax: 86-25-84395325; E-mail: fqliu20011@sina.com

作者简介: 杨万风 (1979 -) 男, 江苏兴化人, 硕士研究生, 研究方向为植物病原细菌致病机理。E-mail: ywf307@163.com

收稿日期: 2006-07-04; 接受日期: 2006-09-01; 修回日期: 2006-11-04

2 μ L dNTP(2.5mmol/L),0.5 μ L GF/GR(20pmol/L),0.2 μ L Ex Taq(5U/ μ L),1 μ L RsGD42 gDNA(50ng/ μ L),补足水至25 μ L。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 20s,54 $^{\circ}$ C 50s,72 $^{\circ}$ C 1min,30个循环,72 $^{\circ}$ C 5min。PCR获得约700bp的片段,回收后连接于pMD18-T,转化宿主菌DH5 α 在LB+Amp平板上筛选转化子。经PCR扩增和酶切验证阳性转化子。

1.3 基因序列测定和分析

由TaKaRa公司进行序列测定。Blast程序进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较,DNAMan、DNAStar和BioEdit软件进行序列分析。

1.4 *gacA* 基因插入突变株的构建

突变株的构建按Skorn等^[12]的方法进行。以引物XOR1/XOR2(引物序列XOR1:5'-GCTTCTAGAATCGTGCTGTGCGACCTG-3';XOR2:5'-GCTTCTAGATCCTGGATGCCGACCTTT-3',下划线处为添加的Xba I酶切位点)扩增*gacA*基因的内部序列XOR(151~584bp),扩增条件同上。产物连接pMD18-T,构建载体pXORs,用PCR和酶切验证并测序,确保不移码。将pXORs电击转化野生菌RsGD42感受态细胞,NA+Amp平板筛选转化子。将在平板上生长的菌落重新点接于一新的NA+Amp平板上,在其上生长的即为可能的突变株。由于pXORs中所带有的ColE1复制起点不能在RsGD42中独立复制,所以只有通过单交叉(single cross-over event)同源重组将整个质粒整合入RsGD42染色体DNA的菌株才能在含Amp的平板上生长,形成克隆。但由于Xooc易对氨基青霉素抗性产生耐受,经转化后在NA+Amp平板上长出的Xooc多数为野生型菌株,故将在平板上长出的接合子用pUC系列载体上的氨基青霉素抗性基因的引物APR1/APR2(APR1:5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'/APR2:5'-TGCTCACCCAGAAA CGCTGCT-3')作PCR,以pUC18作对照,如扩增出氨基青霉素抗性基因的菌落即为可能的突变株。用引物pXAC1/pXAC2(pXAC1:5'-AGGATGACCATCAGAGT TTTTC-3',pXAC2:5'-GGTTCACAGCACCCGGGAGCGA-3')和测序通用引物M4进行PCR扩增来验证突变株。Southern杂交验证质粒插入的正确性。最终得到*gacA*突变株,命名为R5。

1.5 毛细管趋化应答试验

Xooc菌株的趋化应答试验按Mazumder等^[13]的方法进行。在含适当抗生素的NB培养基中培养菌株,等其达到 $OD_{600} = 0.8$ 左右时,离心收集1mL细胞,用BH培养液洗细胞两次,再用50 μ L BH液重悬

细胞。用2.5mL注射器吸取500 μ L的BH+T培养液(BH培养液、0.1% Tryptone),将注射器针头插入到50 μ L悬浮细胞的BH液中,室温静置10min后将注射器取出,注射器中的500 μ L BH+T培养液于28 $^{\circ}$ C培养箱培养6h后稀释涂NA平板。采用平板记数法测定500 μ L的BH+T培养液中相应菌株的活菌数。

1.6 致病性测试

将在NB内培养好的菌液稀释到 $OD_{600} = 0.8$ 左右,用接种针穿刺接种孕穗期的杂交稻汕优63,每菌接20张叶片,接种后植株置于温室生长,温室从早上7:30到下午18:30提供光照且温度保持在28 $^{\circ}$ C,其余时间保持在25 $^{\circ}$ C;同时用菌液直接注射烟草叶片。接种48h后观察烟草叶片接种部位有无HR反应的产生。在14d后观察水稻上的发病情况,并用直尺测量病斑长度。把测得的数据输入Excel,每5个数据的平均数为一个处理,共3个处理。用SAS软件进行数据分析。

1.7 *gacA* 基因序列

本文RsGD42菌株的*gacA*基因序列已提交至GenBank,基因登录号为AY900662。

2 结果和分析

2.1 *gacA* 基因的克隆及其结构分析

以RsGD42基因组DNA为模板,通过PCR扩增出约700bp的DNA片段。将连接转化后得到的阳性克隆随机挑选5个送TaKaRa公司测序,测序结果在NCBI网站上Blast分析表明,该片段中含有一个完整的*gacA*同源基因,命名为*gacA_{Xooc}*。NCBI网站蛋白保守域搜索结果表明,GacA_{Xooc}具有同GacA蛋白相似的结构。GacA同源蛋白的N端一般具有和信号分子结合的结构域,调控许多基因的转录;C端具有一个Helix-turn-helix(HTH)结构域,负责多极化以及和启动子DNA结合。GacA_{Xooc}蛋白的N端具有一个Signal receiver domain(REC)结构域(6AA~120AA),C端具有HTH结合DNA结构域(146AA~203AA)。除此之外,GacA_{Xooc}蛋白还包括一个CheB(Chemotaxis response regulator containing a CheY-like receiver domain)的结构功能域(2AA~140AA),可能参与调控细菌的趋化性。

2.2 *gacA* 基因的序列分析

*gacA_{Xooc}*基因全长648bp,编码215个氨基酸的蛋白,推断的相对分子质量为23.2kDa,该蛋白富含

亮氨酸 (Leu)。同源性搜索比较显示,该基因与 *Xac* 的 *gacA* (AE011846) 同源性达 91.2%; 与 *Xcc* 的 *gacA* (AE012315) 同源性达 84.9%; 与水稻白叶枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*, *xoo*) 的 *gacA* (AY870457, 本实验室) 同源性高达 99.7%, 两基因只有在 284 位和 479 位的碱基发生了变化, 由 C 和 G 变为 T; 而与其他细菌的 *gacA* 基因同源性很低。氨基酸序列比较提示 *GacA_{xoo}* 与 *Xanthomonas* 属的 GacA 蛋白的同源性均超过了 95%, 这间接说明 GacA 蛋白在 *Xanthomonas* 属中是保守的。*GacA_{xoo}* 与 *Xylella fastidiosa* (*Xf*) 的 *GacA* (AE012560) 同源性达 78%; 与其它细菌的 GacA 蛋白约有 38% ~ 44% 的氨基酸同源性, 如 *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) 的 GacA (AB054363)、*P. aeruginosa* (*Pa*) 的 GacA (AE004687)、*Salmonella typhimurium* (*St*) 的 SirA (U88651-3)、*Fluoribacter dumoffii* (*Fd*) 的 FalA (AB184968)、*Legionella pneumophila* (*Lp*) 的 GacA (AY078981)。

2.3 *gacA* 突变株 R5 的验证

将电转化后在 NA + Amp 平板长出的 *Xoo* 菌落用 APRI/APR2 引物作 PCR 筛选有质粒插入的菌株。大量筛选后得到一株阳性克隆, 命名为 R5, 作进一步的验证。

2.3.1 PCR 验证: 分别提取野生菌 RsGD42 和突变菌 R5 的基因组 DNA, 用引物 pXAC1/pXAC2 (扩增 *gacA_{xoo}* 完整序列) 扩增。由于 R5 *gacA* 基因中有质粒 pXORs 的插入, 故扩增出的条带应为 RsGD42 *gacA* 基因和载体 pXORs 的碱基之和 (648bp + 2686bp + 434bp) 经过 PCR 确实得到了这样的结果。此外还用 pXAC2 和 pUC 系列载体的测序通用引物 M4 作为引物进行 PCR, 因 RsGD42 染色体 DNA 中没有引物 M4 的结合位点, 故不应扩出任何条带, 而 R5 基因组 DNA 中有 pXORs 的插入, 应能扩出 0.6kb 左右的条带。PCR 结果也与此完全相符。

2.3.2 Southern 杂交验证: 用 *Xho* I 酶单酶切 RsGD42 和 R5 的基因组 DNA, 以 pXAC1/pXAC2 的扩增产物为探针进行 Southern 杂交分析。由图 1 可见, RsGD42 染色体中 *Xho* I 酶切片段长度为 1.5kb, 泳道 2 为突变株 R5 的片段长度, 约 4.6kb。由此表明在 R5 基因组中, pXORs 已经插入到 *gacA* 基因中。

2.4 *gacA* 基因具有调控细菌趋化应答反应

采用平板记数法测定 500 μ L 的 BH + T 培养液中相应菌株的活菌数, 以检测突变体对 0.1% Tryptone 的趋化应答能力, 以 BH 培养液作对照, 实

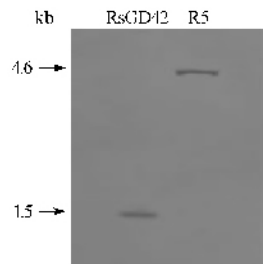


图 1 Southern 杂交验证突变株

Fig. 1 Southern blot analysis of the mutant using the product of PXAC1/PXAC2 primers as a probe.

验重复 3 次。从图 2 看出, 野生型和突变体都能对 0.1% Tryptone 作出反应, 但是无论是 BH 培养液还是 BH + T 培养液, *gacA* 突变体通过毛细管作用进入注射器内的群体数量较野生型明显降低, 表明 *gacA* 突变体的趋化能力有了一定程度的下降。

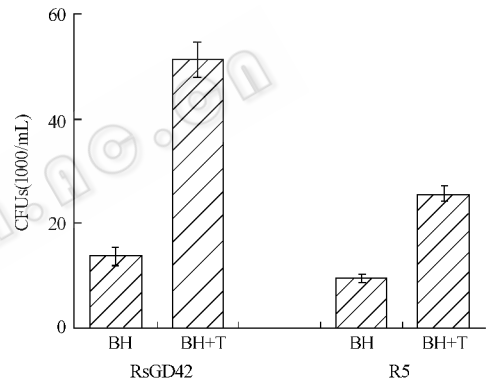


图 2 水稻条斑病菌的趋化应答比较

Fig. 2 Comparison of chemotactic responses of *Xoo*. Bar represent standard error of the means.

2.5 *gacA* 基因突变不影响细菌致病性

从图 3 中可知, 突变体的致病力和野生型菌株相比没有大的差异, 这说明 *gacA* 基因不是 *Xoo* 致病所必需的, 另外突变体仍和野生型一样可激发烟草的 HR 反应 (结果未显示)。

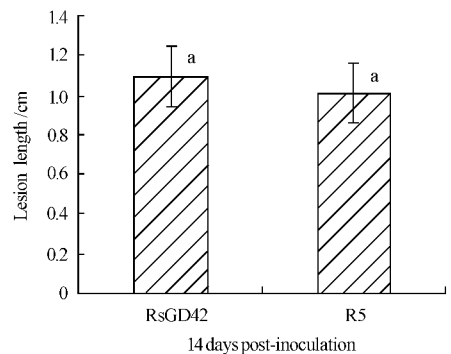


图 3 *gacA* 基因突变体 R5 致病力检测结果

Fig. 3 Virulence test results of the *gacA* mutant. Bar represent standard error of the means. Treatment means marked with the same letter at different varieties and not differ significantly ($P < 0.05$). im. ac. cn

3 讨论

由 *Xooc* 引起的水稻条斑病是危害水稻生产的重要细菌病害之一,因此研究水稻条斑病菌的感应调节系统对预防和降低它对水稻生产的危害具有重要的意义。本文依据已报道的黄单胞菌 *gacA* 基因序列设计简并引物,用异源基因克隆法从水稻条斑病菌中克隆了 *gacA* 基因。通过与数据库中其他 DNA 序列和已知的功能蛋白进行比对分析后发现,*GacA_{Xooc}* 和其他的 *GacA* 蛋白相似。同时我们利用插入突变法,构建了 *gacA_{Xooc}* 基因的插入突变株,为验证其基因的功能奠定了基础。

通过与野生型菌株的对比试验发现,*gacA* 基因突变后仍具有较强的致病性,其在感病寄主上的病斑长度和野生型相比没有太大的差异,而且仍可以激发非寄主烟草的过敏反应。除此之外,*gacA* 基因突变体的胞外蛋白酶、铁载体分泌、菌体游动性、群体感应信号分子的分泌和野生型相比没有大的变化(数据未显示)。以上结果表明在 *Xooc* 中,*gacA* 基因并不像在 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000^[31]、*P. fluorescens* CHAO^[14]和 *Serratia plymuthica* IC1270^[7]等细菌中那样全局性地调控细菌的各种生命活动。

有关趋化性的研究主要集中在 *E. coli*^[15]。*E. coli* 的 *che* 基因簇的功能已鉴定,并提出了细菌趋化应答模式,由接受外界信号刺激的受体蛋白超分子复合物和引起细菌运动的鞭毛-motor 复合物及在这两类超分子复合物之间传导信号的趋化蛋白组成了细菌的趋化信号系统。在细菌的趋化应答系统中应答调节蛋白 CheB 与甲基转移酶 CheR 共同调控趋化受体的甲基化水平。位于 CheB 蛋白的 N 末端调节域上的天冬氨酸残基的磷酸化能激活其 C-末端催化域活性,即趋化受体蛋白的去甲基化^[15]。细菌基因组中往往存在 *che* 基因簇,在 *Xoo* 基因组中存在两个拷贝的 *che* 基因簇^[16]。对 *Xooc* *GacA* 蛋白的结构分析发现,其 N 端具有和信号分子结合的结构域 REC,C 端具有一个 HTH 结构域。除此之外,它还有一个 CheB 的功能域,暗示可能与细菌的趋化性相关。通过毛细管趋化应答试验发现 *GacA* 突变体趋 0.1% Tryptone 有了明显的降低。所以说 *gacA* 基因可能与水稻黄单胞菌趋化性相关。然而,*gacA* 基因如何调控水稻条斑病菌趋化性,以及调控所涉及到的相应基因的转录和表达都需要作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, **14**(12):1351-1363.
- [2] Chieda Y, Iiyama K, Yasunaga-Aoki C, et al. Pathogenicity of *gacA* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **244**(1):181-186.
- [3] Chatterjee A, Cui Y, Yang H, et al. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate Sigma factors. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, **16**(12):1106-1117.
- [4] Ge YH, Huang XQ, Wang SL, et al. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **237**(1):41-47.
- [5] Souza JTD, Mazzola M, Raaijmakers JM. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol*, 2003, **5**(12):1328-1340.
- [6] Chancey ST, Wood DW, Pierson LS. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6):2294-2299.
- [7] Ovadis M, Liu XG, Gavriel S, et al. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *J Bacteriol*, 2004, **186**(15):4986-4993.
- [8] Blumer C, Heeb S, Pessi G, et al. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(24):14073-14078.
- [9] Eriksson AR, Andersson RA, Pirhonen M, et al. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, **11**(8):743-752.
- [10] Ohad GM, Gil S. The *Legionella pneumophila* GacA homolog (LetA) is involved in the regulation of *icm* virulence genes and is required for intracellular multiplication in *Acanthamoeba castellanii*. *Microb Pathogenesis*, 2003, **34**(4):187-194.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [12] Skorn M, Siritida R, Rojana S, et al. Construction and physiological analysis of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *recA* mutant. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **169**(2):269-275.
- [13] Mazumder R, Phelps TJ, Krieg NR, et al. Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J Microbiol Meth*, 1999, **37**(3):255-263.
- [14] Schmidli-Sacherer P, Keel C, Defago G. The global regulator GacA of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is required for suppression of root diseases in dicotyledons but not in Gramineae. *Plant Pathol*, 1997,

- [15] Hendrik S , George WO. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Bio R* , 2004 , **68** (2) :301 – 319.
- [16] Lee BM , Park YJ , Park DS , *et al.* The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331 , the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res* , 2005 , **33** (2) :577 – 586.

Cloning , sequencing and functional study of *gacA* gene from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

YANG Wan-feng , CHEN Lei , LIU Hong-xia , HU Bai-shi , LIU Feng-quan *

(*Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects of Chinese Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 ,China*)

Abstract : A *gacA* homologue , designated *gacA_{Xooc}* , was cloned from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xooc*) , a bacterium that causes leaf streak of rice , with degenerated primers by polymerase amplification reaction (PCR). NCBI blast search indicated that *GacA_{Xooc}* had a similar structure to that of other *GacA* proteins , and had a CheB (Chemotaxis response regulator containing a CheY-like receiver domain) domain. Sequence comparison showed that the *gacA_{Xooc}* was conserved in the *Xanthomonas* genus. Homology search revealed that the *gacA_{Xooc}* was 99.7% similarities to *gacA* (AY870457 , this lab) of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). A *gacA_{Xooc}* disruption mutant was successfully generated by a single cross-over event , and confirmed by PCR and Southern blot. But the mutant still had strong pathogenicity and its virulence was not obviously different from that of wild type strain. The *gacA* did not globally regulate metabolism in *Xooc* , which was different from DC3000 of *P. syringae* pv. *tomato* , CHAO of *P. fluorescens* and IC1270 of *Serratia plymuthica* . Chemotaxis to 0.1% tryptone of the mutants was reduced compared to wild type strain. The results suggest that *gacA_{Xooc}* is involved chemotaxis of *Xooc* . Nevertheless , how *gacA* to regulate chemotaxis of *Xooc* , transcription and expression of genes involved in regulation still need to be further studied.

Keywords : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xooc*) ; *gacA* gene ; disruption mutant ; chemotaxis

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30070497) ; Chinese National Programs for High Technology Research Development (2002AA245041)

* Corresponding author. Tel : 86-25-84396726 ; Fax : 86-25-84395325 ; E-mail : fqliu20011@sina.com

Received 4 July 2006 / Accepted 1 September 2006 / Revised 4 November 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>