

TAIL-PCR 方法快速分离 *Xcc* 致病相关基因序列

应 革 武 威 何 朝 族 *

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 以 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子中 *nptII* 片段作为探针,对已获得的五株野油菜黄单胞菌野油菜黑腐病致病型 (*Xcc*) 非致病突变体进行了 Southern blot 分析,结果表明,这五株突变体确由 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入致病相关基因所致,且为单拷贝不同位点的插入。提取这五株突变体总 DNA 作为模板,采用改进的热不对称交错 PCR (TAIL-PCR) 方法从其中克隆到了各自转座子插入区侧翼序列,对这些侧翼序列进行了序列测定并将分析结果与 GenBank database 及 *Xcc* 全基因组序列做了比较,结果表明,五个侧翼序列所在的基因确与 *Xcc* 致病性有关。这种改进后的 TAIL-PCR 方法为突变体特别是转座子插入突变体中目的基因的克隆提供了一种简便高效的新方法。

关键词 *Xcc*, 致病相关基因, mini-Tn5 *gfp-km* 转座子, TAIL-PCR

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0182-05

野油菜黄单胞菌野油菜黑腐病致病型 [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Parmel) Dowson 简称 *Xcc*] 为假单胞菌科、黄单胞菌属的革兰氏阴性杆菌,可侵染大白菜、中国甘蓝、球茎甘蓝、萝卜、油菜、花椰菜等大多数十字花科作物而引起黑腐病 (Black rot, 俗称半边瘫),被认为是世界范围内对该科作物危害最为严重的病原菌。在热带、亚热带地区如我国南方,由于温度、湿度适宜,病害尤为严重,对其防治措施的研究具有重要的现实意义。^[1]

植物病害的发生实质上是一定条件下植物与病原两者间一系列基因或基因产物相互作用的结果,因而对其防治的研究必然涉及植物抗病机制和病原致病机制两个方面^[2]。对于后者来说,病原必须克服植物的一系列防御反应才能成功地引起病害,可见其致病过程十分复杂,相关的基因必然很多,要深入了解病原致病的分子机制,就必须对这些基因进行分离与分析。自 80 年代以来, *Xcc* 已作为一种模式病菌从其中鉴定和克隆出了许多致病相关基因,并对他们的结构与功能等作了深入分析^[3,4]。本研究在已获得的 5 株 *Xcc* 致病相关基因 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入突变体的基础上,通过各种方法比较,最终选用经过改进后的热不对称交错 PCR^[5] (Thermal asymmetric interlaced PCR 简称 TAIL-PCR) 方

法从这些突变体中成功地克隆到了各自的致病相关基因,为今后的进一步研究打下基础,同时,这种改进后的 TAIL-PCR 方法也为其它突变体特别是转座子插入突变体中目的基因的克隆提供了一种新方法,与其他基因克隆方法尤其是经典的质粒拯救方法相比,本方法具有明显的简便、快速、高效、特异等优点。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒: *Xcc* 致病相关基因的 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入突变体 1~5 # 由本室制备 (有关它们的具体制备方法和表型将另文发表); 质粒 pTGN^[6] (含 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子) 由新加坡 Pan Shen Q. 博士惠赠; *Xcc* 野生型菌株 CN 和 8004、*E. coli* DH5 α 由本室保存。

1.1.2 试剂与其他: 同位素³²P 购自 Dupont 公司; 探针标记试剂盒 Ready-To-GoTM DNA Labelling Beads (-dCTP) 购自 Amersham Pharmacia 公司; DNA 片段回收试剂盒 E. Z. N. A[®] Gel Extraction Kit、质粒提取试剂盒 E. Z. N. A[®] Plasmid Miniprep Kit II 购自 Omega 公司; T-载体系统 pGEM-T EasyVectorSystems 购自 Promega 公司; 3 种 Taq 酶分别来自上海生工生物工

收稿日期 2001-08-10, 修回日期 2001-10-25。

基金项目: 中国科学院创新方向基金资助 (No. KXCX2-1-02-01)。

* 通讯作者。Tel: 86-10-62642536; E-mail: hecz@sun.im.ac.cn

程技术服务公司 (Taq, Taq plus polymerase) 及本室; 限制性核酸内切酶均来自 GIBCO 公司; 引物由上海生工生物工程技术服务公司合成; 测序由上海基康生物技术有限公司完成; *Xcc* 基因组文库由本室构建。

1.2 实验方法

1.2.1 *Xcc* 非致病突变体及野生型基因组 DNA 的提取

各取 1.5 mL *Xcc* 非致病突变体 1~5 号及野生型 *Xcc* CN、*Xcc*8004 的过夜液体培养物离心收集菌体, 加 400 μ L 裂解液 (40 mmol/L Tris-HAc, 20 mmol/L pH 7.8 NaAc, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS) 及 200 μ L 5 mol/L NaCl 溶液将菌体沉淀吹打混匀后离心收集上清, 等体积氯仿抽提两次, 两倍体积无水乙醇离心沉淀, 70% 乙醇洗涤, 最后溶于适量 ddH₂O 中。1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 *Xcc* 非致病突变体中 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入的检测

各取 1 μ g *Xcc* 非致病突变体与野生型 *Xcc* 的基因组 DNA 及 50 ng pTGN 质粒用 *Sma*I 酶切过夜, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 碱法^[7]转移至尼龙膜上。再以 primer1、primer2 为引物, 从 pTGN 质粒中扩增 *npt* II 片段, 以 ³²P 标记为探针进行 Southern 杂交, 检测 *Xcc* 非致病突变体中 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入情况。

primer1 5'-GGTCCCTGAATGAACTG-3'

primer2 5'-TAGCCAACGCTATGTCCT-3'

1.2.3 TAIL-PCR 方法克隆 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入区侧翼序列

根据获知的 *gfp* 序列, 在其 5' 端设计 3 个向外的特异性巢式引物 sp1、sp2、sp3 (见图 1), 再参照文献^[6,8]设计 7 个随机简并引物 AD1~7 (见表 1), 同时准备 3 种 Taq 酶, 然后以 20 ng 的 1~5 号突变体基因组 DNA 为模板, 3 个特异性巢式引物与任一种随机引物及任一种 Taq 酶组合进行 TAIL-PCR 扩增 (反应体系及反应条件见表 2、表 3), 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物大小。

1.2.4 TAIL-PCR 扩增产物的测序

TAIL-PCR 的最终产物与 T 载体 pGEM-T Easy 连接后电激转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白筛选阳性克隆后, 提取并纯化质粒, 再取少量质粒用 *Eco*R I 酶切鉴定, 对插入片段大于 300 bp 的重组质粒测序。

1.2.5 与 *Xcc* 基因组全序列的比较

测序结果中去除 T 载体 pGEM-T Easy 序列、mini-Tn5 *gfp-km* 转座子序列及随机引物序列后得到转座子插入区侧翼序列, 分别与 *Xcc* 基因组序列、GenBank database 作 Blastn、Blastx 比较, 得到目的基因的结构及可能的功能信息。

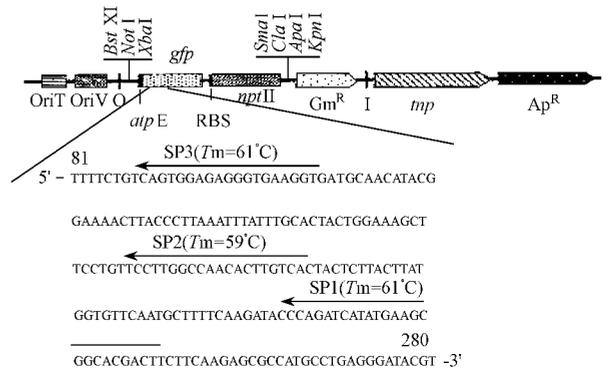


图 1 pTGN 质粒中转座子 mini-Tn5 *gfp-km* 的结构及 TAIL-PCR 特异性引物在其上的位置

Fig. 1 Structure of mini-Tn5 *gfp-km* transposon in pTGN and sites of special primers used for TAIL-PCR on it

The *gfp-nptII* operon is promoter-less. The GFP ORF contained its own start codon and the *atpE*, translational signal. The *NptII* ORF included its own ribosome-binding site (RBS) and start codon. GmR represents the gene encoding gentamicin resistance; *atpE* the efficient translation region of the *E. coli atpE* gene; I and O, inverted repeats of IS50; *tnp* the gene encoding Tn5 transposase; *oriT*, RP4 transfer origin; *oriV*, R6K origin of replication. Special primers used for TAIL-PCR were complementary to *gfp* of mini-Tn5 *gfp-km*. The distance from 5' terminus of *gfp* to O region was 120 bp.

表 1 随机简并引物

Table 1 AD Primers

| Primer No | Primer sequence |
|--------------|--|
| AD Primers 1 | 5'-NTCGA(G/C)(A/T)(G/C)(A/T)GTT-3' |
| AD Primers 2 | 5'-NGTCGA(G/C)(A/T)GANAC(A/T)GAA-3' |
| AD Primers 3 | 5'-(A/T)GTGNA(A/T)ANCANAGA-3' |
| AD Primers 4 | 5'-T(A/T)GNA(A/T)ANCA(G/C)AGA-3' |
| AD Primers 5 | 5'-AC(A/T)GNA(A/T)ANCA(A/T)AGG-3' |
| AD Primers 6 | 5'-CA(A/T)CGICNGAIA(G/C)GAA-3' |
| AD Primers 7 | 5'-T(G/C)TICGNACTI(A/T)XGA-3' |

表 2 TAIL-PCR 反应混合液的组成

Table 2 The compose of TAIL-PCR reaction mixture

| Reagent | Amount in Primary reaction mixture/ μ L | Amount in Second reaction mixture/ μ L | Amount in Tertiary reaction mixture/ μ L |
|-----------------------|---|--|--|
| 10xbuffer | 22 | 22 | 22 |
| 2 mmol/L dNTPs | 10 | 5 | 5 |
| 25 pmol/ μ L AD | 20 | 20 | 20 |
| 20 pmol/ μ L SP | 1 | 1 | 1 |
| Taq (5U/ μ L) | 2 | 2 | 2 |
| ddH ₂ O to | 200 | 200 | 200 |

(Each reaction aliquot contained 18 μ L of TAIL-PCR mixture and to which 2 μ L diluted template was added. For the secondary and Tertiary PCR, Template came from the product of last cycle and was diluted 100 times before reaction.)

表 3 TAIL-PCR 反应条件

Table 3 Cycling conditions used for TAIL-PCR

| Reaction | File No | Thermal cycling condition | Cycle No |
|-----------|----------|--|--|
| Primary | 1 | 92°C 2min, 95°C 1min | 1 |
| | 2 | 95°C 15s, 61°C 15s, 72°C 30s | 5 |
| | 3 | 95°C 15s, 25°C 3min ramping to 72°C over 3min, 72°C 2min | 1 |
| | 4 | 95°C 15s, 44°C 15s, 72°C 30s | 3 |
| | 5 | 95°C 10s, 61°C 15s, 72°C 30s 95°C 10s, 61°C 15s, 72°C 30s 95°C 10s, 44°C 15s, 72°C 30s | 12 |
| | 6 | 72°C 5min | 1 |
| Secondary | 7 | 95°C 10s, 59°C 15s, 72°C 30s 95°C 10s, 48°C 15s, 72°C 30s | 13 |
| | 6 | 72°C 5min | 1 |
| | Tertiary | 8 | 95°C 10s, 61°C 15s, 72°C 30s 95°C 10s, 61°C 15s, 72°C 30s 95°C 10s, 48°C 15s, 72°C 30s |
| 6 | | 72°C 5min | 1 |

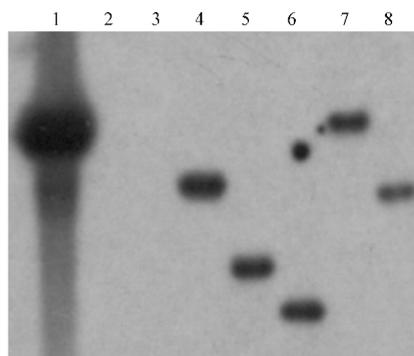
2 结果与分析

2.1 *Xcc* 非致病突变体 1~5 # 与野生型 *Xcc* CN、8004 基因组 DNA 的提取及突变体中 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入的检测

用 1.2.1 中所述方法分别提取到 *Xcc* 非致病突变体 1~5 # 及野生型 *Xcc* CN、8004 基因组 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测大小在 30kb 以上(结果略)。再以上述基因组 DNA 进行 Southern blot 分析, *Xcc* 野生型 CN 和 8004 无 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入作为负对照, 结果确为阴性; pTGN 质粒含 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子作为正对照, 结果确为阳性; 突变体 1~5 # 中都有 mini-Tn5 *gfp-km* 插入, 且为单拷贝不同位点的插入, 表明这些突变确由 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入所致, 而且是不同位点的突变(见图 2)。

2.2 *Xcc* 非致病突变体中插入区侧翼序列的克隆及测序

在 1% 琼脂糖凝胶上各取适量 TAIL-PCR 第二轮及第三轮扩增产物电泳。第三轮产物比第二轮产物稍小, 但大于 300bp 者为阳性, 且只有一条带为最佳(4 # 结果见图 3, 其余略)。经过不同组合 5 株突变体的第三轮阳性产物全部得到(见表 4)。分别与 T 载体 pGEM-T Easy 连接、克隆后, *Eco*RI 酶切鉴定结果均符合要求(4 # 结果见图 4, 其余略)。重组质粒测序结果略。

图 2 突变株中 mini-Tn5 *gfp-km* 转座子插入的 Southern blot 分析Fig. 2 Southern blot analysis of mini-Tn5 *gfp-km* insertion of mutants

1. *Sma*I-digested pTGN, mini-Tn5 *gfp-km* positive control DNA ;2&3. *Sma*I-digested genomic DNA of *Xcc* CN 8004, mini-Tn5 *gfp-km* negative control DNA ;4 ~ 8. *Sma*I-digested genomic DNA of *Xcc* nonpathogenic mutants 1 ~ 5 #

表 4 五株突变体 TAIL-PCR 反应组合及结果

Table 4 Results and compositions of TAIL-PCR of 5 mutants

| | Assembly of TAIL-PCR element | Length of TAIL-PCR final product/bps |
|-----|------------------------------|--------------------------------------|
| 1 # | sp1-3, AD2, Taq pol. 1 | 345 |
| 2 # | sp1-3, AD6, Taq pol. 2 | 321 |
| 3 # | sp1-3, AD7, Taq pol. 2 | 388 |
| 4 # | sp1-3, AD3, Taq pol. 3 | 430 |
| 5 # | sp1-3, AD7, Taq pol. 3 | 588 |

(Taq pol. 1 :Taq polymerase from Sangon, Shanghai; Taq pol. 2 :Taq plus polymerase from Sangon, Shanghai; Taq pol. 3 :Taq polymerase from our own laboratory.)

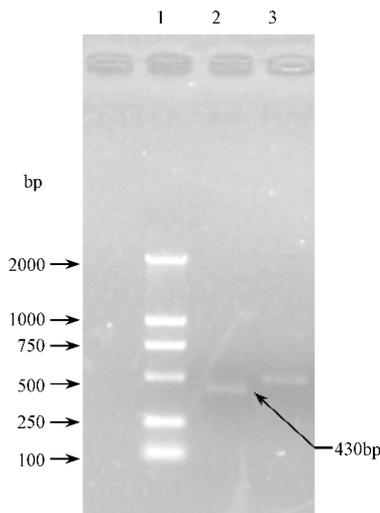


图 3 4 # 突变体 TAIL-PCR 结果的电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analysis of TAIL-PCR product of mutant 4 #

1. DL-2000 marker ; 2. Product of tertiary PCR reaction ;

3. Product of secondary PCR reaction

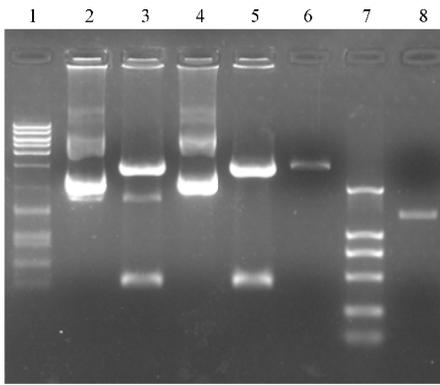


图 4 4# 突变体插入区侧翼序列的酶切鉴定

Fig.4 Identification of the sequence flanking insertion site in mutant 4# by digestion

1. 1kb marker (Amersham Pharmacia); 2&3. Linking product with pGEM-T Easy vector in clone 1 & 5. Linking product with pGEM-T Easy vector in clone 2 (2&4. Linking product; 3&5. *EcoRI*-digested linking product); 6. *EcoRI*-digested pGEM-T Easy vector; 7. DL-2000 marker; 8. pGEM-T Easy vector

2.3 *Xcc* 非致病突变体中插入区侧翼序列与 *Xcc* 基因组全序列的比较

4# 转座子插入区侧翼序列全长 187bp, 与 *Xcc* 基因组全序列相比较, 同源率为 100%, 所在位点为 4277178-4277364bp, 所在 ORF 为 4279430-4277154bp; 再与 GenBank database 相比较, 与 *Xcc* XC1708 xpsD precursor (M81648.1) 核酸序列的同源率为 100%。XpsD precursor (AAA27615.1) 是一种已知外膜蛋白, 作为 *Xcc* 蛋白分泌系统 II 的组成部分, 与果胶酶、 α -淀粉酶、葡聚糖内切酶等胞外酶的分泌密切相关, 它的突变将导致胞外酶在周质空间中的积累, 是一种致病相关因子^[13,14]。这表明 4# 突变体的确是致病基因发生了插入突变。其余突变体的比较结果中 2#、3#、5# 分别与已知致病因子调节基因、磷酸核糖表位酶基因及外膜蛋白基因同源性较高 (> 60%), 1# 的同源性较低 (< 30%), 推测可能为新基因, 结果将另文发表。

3 讨 论

本实验采用改进的 TAIL-PCR 的方法从 5 株 *Xcc* 非致病突变体中成功地克隆出了各自相关基因。结果表明, 所得 5 个相关基因确与 *Xcc* 致病性有关。下一步的工作中我们准备对克隆得到的这几个基因的结构、功能、表达调控等做进一步的分析。

当前, 随着后基因组时代的来临, 功能基因组学的研究迫切需要了解基因组时代所释放的大量未知基因的功能, 制备突变体是一种非常有效的解决办

法, 而转座子插入突变已成为制备突变体的常规选择^[9], Igor Y. Goryshin 等^[10]利用体外制备的 Tn5 转座复合物电激制备转座插入突变体则更将这一方法推陈出新^[11]。但接下来从转座插入突变体中克隆相关基因的方法有很多^[12], 本实验报道的 TAIL-PCR 方法与其它方法尤其是经典的质粒拯救方法相比, 具有明显的优点, 例如: 它简便、快速, 通常一次反应 6、7h 后就可见结果, 而质粒拯救法最少 3 天; 另外它特异、高效, 只要 PCR 最终产物符合大小要求, T 载体连接转化后阳性克隆比例高, 不含侧翼序列的假阳性克隆比例很低, 筛选容易, 而质粒拯救法所得假阳性克隆比例则很高, 精度差, 因而筛选繁琐, 工作量大, 还有, 由于它操作程序化, 引物可通用, 尤其适合于同时处理大批量样品, 有自动化应用的前景。当然, TAIL-PCR 方法也有缺陷, 如不是每次反应都有阳性结果, 需要的组合可能较多等等。但总的来说, TAIL-PCR 不失为一种简便高效的基因克隆方法, 尤其在后基因组时代可作为突变体研究的良好技术平台, 值得改进与推广。

本研究中, 为达到更好的效果, 我们已经对 TAIL-PCR 方法做了一些改进。首先, 我们在第三轮 PCR 中仍采用 TAIL 循环而不是经典循环, 既增加了最终产物中目的片段的丰度, 又大大降低了非特异性产物的干扰; 其次, 我们用 3 种不同的 Taq 酶与已有随机简并引物组合, 大大增加了可选性与成功率 (具体原因尚待探讨); 还有, 鉴于用 TAIL-PCR 最终产物直接测序 (文献 [5] 中推荐) 效果不好, 我们将之首先转入 T 载体中 (之前未经纯化), 转化鉴定后再送测菌株或质粒, 效果非常理想。需要特别注意的是: 考虑到特异引物并不总在已知序列最末端, 因此可用的 TAIL-PCR 最终产物必须满足一定的大小 (本实验中需不小于 300bp), 否则不能包含侧翼序列在内。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Swings J G, Civerolo E L. *Xanthomonas* 1st edition, London: Chapman&Hall, 1993, pp. 51 ~ 55
- [2] Alan Collmer, Determination of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology*, 1998, 1: 329 ~ 335
- [3] Tseng Yi-hsiung, Choy Ka-tim et al, Chromosome map of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17 with locations of genes involved in Xanthan gum synthesis and yellow pigmentation. *Journal of bacteriology*, 1999, 181: 117 ~ 125

- of a DNA Fragment from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Complen-ting its Exopolysaccharide Deficient Mutant T113. *Journal of Gangxi agricultural and biological science*(广西农业生物科学),1999, **18** :15 ~ 19
- [5] Liu Yao-Guang ,Robert F. Whittier , Thermal asymmetric interlaced PCR : automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *GENOMICS*, 1995 **25** :674 ~ 681
- [6] TANG X , LU B F , PAN S Q. Abifunctional transposon mini-Tn5 *gfp-km* which can be used to select for promoter fusions and report gene expression levels in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters* , 1999 **179** :37 ~ 42
- [7] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* , 2nd Edition ,Beijing : Science press , 1992 , pp.480 ~ 482
- [8] Serguei Parinov ,Mayalagu Sevugan ,De Ye *et al.* Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines : a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* , 1999 , **11** : 2263 ~ 2270
- [9] YANG I(杨琳) , WANG J K(王金发). The transposon tag in the plant gene engineering. *Biotechnology*(生物技术) , 2000 , **10** : 22 ~ 27
- [10] Ignor Y. Goryshin , Jerry Jendrisak , Les M. Hoffman , *et al.* Reznikoff ,Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes , *Nature biotechnology* , 2000 , **18** : 97 ~ 100
- [11] Magalie R. Guilhabert , Les M Hoffman ,David A. Mills. Kirkpatrick ,Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. *Molecular plant-microbe interactions* , 2001 **14** : 701 ~ 706
- [12] SUN C X(孙春晓) , YU C H(于常海) *et al.* A brief introduction to the methods for novel gene cloning. *Progress in physiological sciences* (生理科学进展) 2000 **31** : 35 ~ 42
- [13] Lee H M ,Wang C ,LIU Y L , *et al.* Association of the cytoplasmic-membrane protein XpsN with the outer membrane protein XpsD in the type II protein secretion apparatus of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* 2000 **182** :1549 ~ 1557
- [14] Hu N T , Hung M N , Chiou S J , *et al.* Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* , 1992 , **174** : 2679 ~ 2687

Cloning of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Pathogenicity-related Gene Sequences by TAIL-PCR

YING Ge WU Wei HE Chao-Zu *

(Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China)

Abstract Southern blot analysis with probe from mini-Tn5 *gfp-km* transposon indicated that 5 non-pathogenic mutants which were generated by insertion of mini-Tn5 *gfp-km* mutagenesis contained a single copy of the transposon. Using genomic DNA of each mutant as a template ,TAIL-PCR was performed with seven arbitrary degenerate(AD) primers pairing with 3 nested specific primers designed based on the sequence of GFP toward outside in mini-Tn5 *gfp-km* . After 3-step PCR reactions , the flanking sequence of each mutant was obtained. The PCR product was ligated with pGEM-T EASY vector and then was transformed into *E. coli* DH5 α by electroporation. Positive clones were selected by white/blue colony and plasmid was isolated , then digested with EcoRI. Plasmid was sequenced if its insert was longer than 300 bp. Our results indicated that TAIL-PCR was proved to be a simple and efficient approach in identification of gene using insertion mutagenesis.

Key words *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) , pathogenicity-related gene , mini-Tn5 *gfp-km* transposon , TAIL-PCR