

野油菜黄单胞菌野油菜致病型胞外多糖合成有关的 DNA 序列的克隆*

查冬兴 唐纪良** 马庆生

(广西农业大学分子遗传研究室 南宁 530005)

摘 要 以从野油菜黄单胞菌野油菜致病型 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 胞外多糖突变体 T117 中克隆到的含有突变序列的 DNA 片段作探针, 从野生型菌株中鉴定和克隆了含有相应序列的 9.4kb Hind III 片段。该片段可反式互补突变体 T117, 完全恢复其胞外多糖的合成, 说明该片段至少含有一个完整的与该菌胞外多糖合成有关的基因。

关键词 野油菜黄单胞菌野油菜致病型, 胞外多糖, 基因克隆

分类号 Q523

细菌产生的胞外多糖在与植物相互作用过程(如寄生和共生)中起重要作用。在共生结瘤中, 胞外多糖突变体失去了结瘤能力^[1]; 在寄生致病中, 不少病菌的胞外多糖突变体都表现出致病性丧失或减弱^[2]。虽然有一些假说^[1, 2], 但胞外多糖在结瘤或致病过程中的作用机理还不十分清楚。

野油菜黄单胞菌野油菜致病型 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 以下简称 Xcc) 不仅是十字花科植物最重要的病原菌之一, 而且它产生的胞外多糖(称为黄原胶, Xanthan gum)在工业上具有广泛的用途^[3]。我们应用转座子 Tn5gusA5 进行诱变, 筛选到一系列突变体^[4], 并通过克隆其中三个胞外多糖突变菌株中的 Tn5gusA5 及其相邻序列, 以及用它们进行标记置换重新构建突变体, 证实了原来的三个胞外多糖突变体都是由于 Tn5gusA5 的插入所致^[5]。而且, 通过用所克隆到的片段作探针与突变体的总 DNA 进行 Southern 杂交, 还证实了这三个突变体中的转座子是插在基因组中的不同区域^[5]。本研究用从其中的突变菌株 T117 克隆到的 Tn5gusA5 及其相邻序列为探针, 从野生型菌株中克隆到了相应的 DNA 片段, 该片段能反式 (*in trans*) 互补突变体 T117, 恢复其胞外多糖的正常合成能力。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

* 国家自然科学基金资助项目 (39100064)。

** 联系人

收稿日期: 1996-12-09

表1 实验所用菌株、质粒的特征和来源

Table 1 List of strains and plasmids

菌株或质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	参考文献或来源 Reference or source
菌株 Strains		
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>		
8004	Wild type, Rif ^R	[6]
T117	<i>Xcc</i> EPS ⁻ mutant	[4]
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[7]
质粒 Plasmids		
pUC119	Amp ^R	[8]
pLAFRI	Tc ^R , Mob ⁺ , Tra ⁻	[9]
pIJ3200	Tc ^R	[10]
pBR322	Tc ^R , Amp ^R	[11]
pHGt1171	Tn5gusA5 and its flanking sequence cloned in pBR322	[5]
pMT46B	9.4kb Hind III <i>Xcc</i> fragment cloned in pUC119	this study
pMT46BP	9.4kb Hind III <i>Xcc</i> fragment cloned in pIJ3200	this study
pMT83	1.9kb EcoRI <i>Xcc</i> fragment cloned in pUC119	this study
pMTP83	1.9kb EcoRI <i>Xcc</i> fragment cloned in pLAFRI	this study
pRK2073	Tra ⁺ , Mob ⁺ , Km ^r :Tn7, Spc ^R , ColE1 replicon	[6]

1.2 培养条件及抗菌素

E. coli 和 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 的培养基和培养条件及抗菌素用量均同文献 [6]。所用抗菌素均购自 Sigma 公司, 分别以英文缩写表示: Tc(四环素)、Km(卡那霉素)、Amp(氨苄青霉素)、Spc(壮观霉素)、Rif(利福平)、Gm(庆大霉素)。

1.3 三亲本接合

野油菜黄单胞菌野油菜致病型之间或与大肠杆菌之间的三亲本接合按照 Turner 等^[6]描述的方法进行。

1.4 胞外多糖检测

野油菜黄单胞菌野油菜致病型胞外多糖检测按 Osbourn 等^[12]的方法。

1.5 分子生物学方法

DNA 提取、限制性内切酶酶切、琼脂糖凝胶电泳、限制性片段的回收、Southern 转移、DNA 同位素标记、杂交、DNA 转化等均按标准方法^[13]或厂家提供的方法。

2 结果

2.1 野生型菌株中与突变位点相应的 DNA 序列的克隆

通过以从突变体 T117 克隆到的 Tn5gusA5 及其相邻染色体序列(重组质粒 pHGt1171 的外源片段)为探针, 与经不同限制性内切酶酶切的野生型菌株总 DNA 片段进行

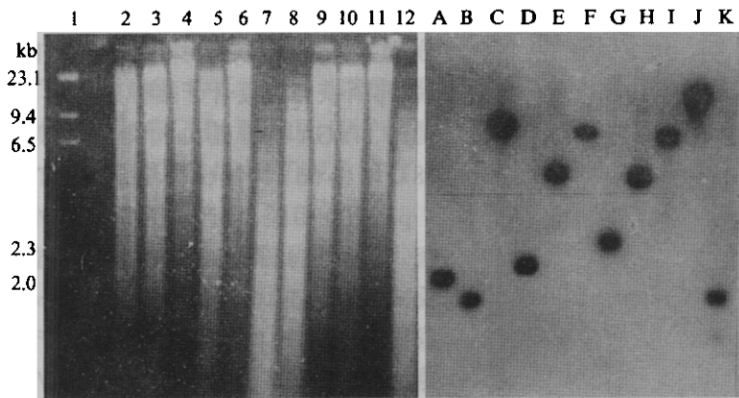


图1 野生型菌株与突变体 T117 的突变位点相对应的 DNA 片段

Fig.1 The DNA fragments in the wild-type strain corresponding to the mutated site in T117
1: λ DNA / Hind III; 2~12: the total DNA of the wild type strain digested with EcoRI, BamHI, Hind III, Sal I, Bgl II, Bgl I, Pvu I, Sac I, Kpn I, Xho I and Pst I, respectively; A~K: the Southern hybridization of the DNA s of lanes 2~12 with the insert of pHGt1171 as a probe.

Southern 杂交, 确定了野生型染色体 DNA 中与突变体 T117 的突变位点相应序列在电泳凝胶中的位置(图 1)。

用 EcoRI 和 Hind III 分别酶解时, 约 1.9kb 和 9.4kb 的片段中含有与突变位点相应的 DNA 序列。从电泳凝胶中分别回收约 1.9kb(EcoRI)和约 9.4kb(Hind III)片段并分别克隆到 pUC119 质粒及转化大肠杆菌 DH5 α 菌株后, 以 pHGt1171 的外源片段为探针与在含有 X-Gal 和 IPTG 的培养基上长出的白色转化子菌落进行菌落原位杂交, 然后, 对获得的阳性克隆进行提取质粒、酶解、电泳及 Southern 杂交分析(图 2), 证实了阳性克隆中的重组质粒的插入片段中确实分别含有与突变位点相应的 DNA 序列。我们将这些重组质粒分别命名为 pMT83(含 1.9kb EcoRI 片段)和 pMT46B(含 9.4kb Hind III 片段)。

2.2 克隆序列对突变体胞外多糖合成功能的互补分析

由于 pUC119 质粒不能在野油菜黄单胞菌中“存活”, 因此, 我们把克隆在以 pUC119 为载体的重组质粒 pMT83 和 pMT46B 中的 1.9kb EcoRI 片段和 9.4kb Hind III 片段分别克隆到广谱宿主质粒 pLAFRI 及其衍生质粒 pIJ3200, 所获重组质粒分别命名为 pMTP83 (pLAFRI 含 1.9kb EcoRI 片段)和 pMT46BP (pIJ3200 含 9.4kb Hind III 片段)。

在 pRK2073 质粒的帮助下, 通过三亲本接合将所获得的重组质粒 pMTP83 和 pMT46BP 分别导入突变

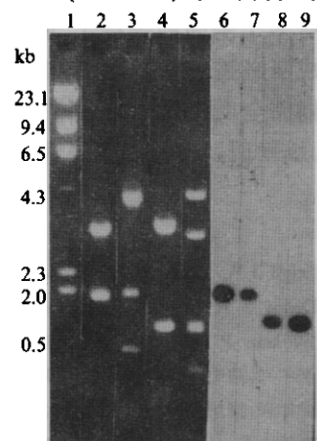


图2 重组质粒 pMT83 和 pMT46B 的验证

Fig.2 Confirmation of the recombinant plasmids pMT83 and pMT46B
1: λ DNA / Hind III; 2: pMT83 / EcoRI; 3: pMT46B / EcoRI; 4: pMT83 / BamHI; 5: pMT46B / BamHI; 6~9: the Southern hybridization of the DNAs of lanes 2~5 with the insert of pHGt1171 as a probe.

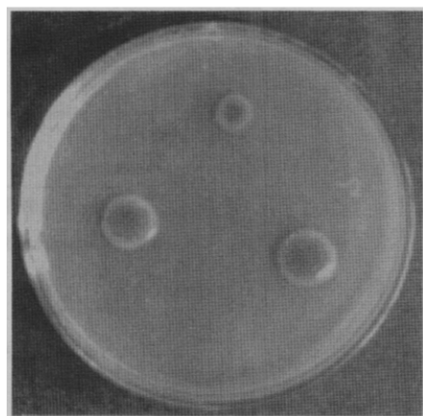


图3 不同菌株的胞外多糖产量比较

Fig.3 Comparison of exopolysaccharide production of different strains

Upper: T117/pIJ3200; Down (left): 8004/pIJ3200; Down (right): T117/pMT46BP.

体菌株 T117,同时,载体质粒 pLAFR1 和 pIJ3200 分别导入 T117 突变株和野生型菌株 8004。最后,将所获得的接合子接种到含有 Rif 和 2% 葡萄糖的 NYGA 培养基上检测胞外多糖的产量,在 28℃ 培养 5d 后,接合子 T117/pMT46BP 与 8004/pIJ3200 相同,均产生大量的胞外多糖,菌落突起、光滑湿润(图3),说明重组质粒 pMT46BP 能反式互补突变体 T117,恢复其胞外多糖的正常合成能力。而 T117/pMTP83 虽能产生少量胞外多糖,但与 T117/pMT46BP 和 8004/pLAFR1 相比相差甚远(图略),说明 pMTP83 虽能使 T117 产生一些胞外多糖,但不能完全互补 T117。

3 讨论

突变体 T117 胞外多糖合成能力的丧失是由于转座子插入在与胞外多糖合成相关的基因上造成的^[5]。重组质粒 pMT46BP 能完全互补 T117,恢复其胞外多糖的正常合成,说明克隆在 pMT46BP 中的 9.4kb Hind III 片段含有这一重要基因的全部序列。pMTP83 只含有其中的 1.9kb EcoRI 片段,只能部分互补 T117,可能这 1.9kb 片段没有包含这一基因的全部序列;也可能突变体中转座子插入破坏的是一个含有多个基因的操纵子,除突变的基因外,操纵子中下游部分(1.9kb 以外)还有胞外多糖合成所必需的基因,由于转座子的插入使这些基因无法正常转录表达,因而,这 1.9kb 序列不能完全反式互补突变体。目前,我们正在对所克隆到的 9.4kb Hind III 片段作深入的研究,以阐明以上问题及了解其中的基因在胞外多糖合成中的作用等。

参 考 文 献

- [1] Leigh J A, Coplin D L. *Annu Rev Microb*, 1992, 46: 307~346
- [2] Denny T P. *Annu Rev Phytopathol*, 1995, 33:173~197.
- [3] Williams P H. *Plant Dis*, 1980, 64:736~742.
- [4] 查冬兴,唐纪良. 广西农业大学学报,1996, 15(1):23~29.
- [5] 查冬兴,唐纪良,马庆生. 广西农业大学学报,1996, 15(4):279~284.
- [6] Turner P, Barber C, Daniels M. *Mol Gen Genet*, 1984, 195:101~107.
- [7] Hanahan D. *J Mol Biol*, 1983, 166:557.
- [8] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. *Gene*, 1985, 33:103.
- [9] Leong S, Ditta G, Heliski D. *Biol Chem*, 1982, 257: 8724~8730.
- [10] Liu Y N, Tang J L, Clarke B R et al. *Mol Gen Genet*, 1990, 220: 433~440.
- [11] Boliver F, Rodriguez R L, Greene P J et al. *Gene*, 1977, 2:95.
- [12] Osbourn A E, Clarke B R, Stevens B J H et al. *Mol Gen Genet*, 1990, 222:145~151.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. N Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

CLONING OF DNA SEQUENCES INVOLVED IN EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS OF *XANTHOMONAS* *CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*

Zha Dongxing Tang Jiliang Ma Qingsheng

(Laboratory of Molecular Genetics, Guangxi Agricultural University, Nanning 530005)

Abstract By using a cloned DNA segment containing the mutated sequences from the exopolysaccharide-deficient mutant T117 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as a probe, a 9.4kb HindIII fragment harbouring DNA sequences corresponding to the mutated site was identified and cloned from the wild-type strain. The fragment could complement the mutant strain T117 *in trans* and restore the synthesis of exopolysaccharide. This indicates that the fragment contains at least an intact gene which is involved in the exopolysaccharide synthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Key words *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Exopolysaccharide, Gene cloning