

大豆斑疹病菌 harpin 编码基因的克隆与特性研究

陈功友 张 兵 武晓敏 赵梅琴

(南京农业大学植物保护学院 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 harpin 编码基因的同源性,设计简并引物,采用 PCR 方法从大豆斑疹病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xag*)中克隆了 402 bp 的 *hpaI* 同源基因,构建于表达载体 pET30(+)上经转化大肠杆菌 BL21 菌株,获得基因工程菌 BHR-3。基因工程菌诱导表达后经收集菌体和破碎细胞,得到表达产物为 15.1kD 的蛋白质。该蛋白质富含甘氨酸,不含半胱氨酸,对热稳定,对蛋白酶 K 敏感,可在非寄主烟草上激发过敏反应。激发的过敏反应需要植物体内水杨酸的积累,还可被真核生物代谢抑制剂抑制。序列比较显示,该基因与 *Xag* 中 *hpaG* 基因相同,与其它黄单胞菌中的 *hpaI* 基因有 51.4% ~ 93.8% 的同源性,与其它革兰氏阴性植物病原细菌的 harpin 编码基因无同源性。据此把该基因产物鉴定为 harpin_{Xag}。黄单胞菌 harpin 蛋白质序列比较发现,GG-GGG 基序的多少并不是 harpin 蛋白的唯一特性。这为利用 harpin 蛋白开展植物病害控制的基因药物学设计提供了科学线索。

关键词 大豆斑疹病菌 烟草 过敏反应 harpin 编码基因

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)04-0496-04

革兰氏阴性植物病原细菌在非寄主植物上可激发过敏反应(Hypersensitive response, HR),在寄主植物上具致病性(Pathogenicity)。这一特性由细菌中 *hrp* 基因簇决定^[1,2]。*hrp* 基因簇的功能之一是形成 III 型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)将编码致病性的效应分子由细菌胞内转运至寄主植物细胞中,从而与植物细胞发生互作^[1,3]。致病性效应分子主要包括 Avr(Avirulence)、Vir(Virulence)、Harpin 和 Dsp(Disease-specific pathogenicity)等。*hrp* 基因簇中某一 *hrp* 基因编码产物 harpin 可在非寄主植物上激发 HR^[3-6]。HR 是植物细胞编程死亡(Programmed cell death, PCD)的一种形式,是植物主动抗病性的结果^[7,8]。因此,克隆植物病原菌中编码 harpin 类蛋白的基因对于揭示植物病原菌致病性机理、植物-病原物互作的分子机制以及研究 harpin 分子的植物体内外应用技术开发植物病害防治等,均具有重要的理论和实践意义。

大豆斑疹病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, *Xag*)是大豆重要细菌病害之一。Jung-Gun Kim 等^[9]在对大豆斑疹病菌 *hrp* 岛进行分析时从 *Xag* 中克隆和表达了编码 harpin 的基因 *hpaG*。Zhu 等^[3]报道了水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)中 *hpaI* 基因,但未明确其产物可在非寄主烟草上激发 HR 功能。闻伟刚等^[4]根据 *hpaI* 基因从 *Xoo* JXOIII 菌株中克隆和表达了具有 harpin

生物学特性和 HR 激发功能的 *hrfA_{Xoo}* 基因。本文依据水稻白叶枯病菌^[3-5]、水稻条斑病细菌(*X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoo* X AY875714)、柑橘溃疡病菌^[10](*X. axonopodis* pv. *citri*, *Xac*)、甘蓝黑腐病菌^[10](*X. campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)和辣椒斑点病菌^[11](*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*)的 *hpaI* 基因序列,设计简并引物,从 *Xag* 中克隆和表达了具有 harpin 蛋白质特征的 *hpaI* 基因,并明确其产物具有 harpin 的理化特性和生物学功能。克隆和表达 *Xag* 的 *hpaI* 基因,目的在于比较黄单胞菌 harpin 类蛋白的结构与功能关系,为开展利用 harpin 蛋白防治植物病害以及基因药物学设计提供科学线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和生长条件 大豆斑疹病菌(本实验室)于 NA 培养基^[4]上 28℃ 下生长,大肠杆菌 BL21 (DE3) 本实验室保存)于 LB 培养基^[4]上 37℃ 下生长。表达质粒 pET30(+)由本实验室提供,抗生素卡那霉素(Km)使用终浓度为 20μg/mL。

1.1.2 试剂 *Ex Taq* 酶(TaKaRa),IPTG、Tris、EDTA、Cycloheximide、 α -Amanitin、LaCl₃、PMSF 和 Protease K (Sigma)。

1.2 PCR 扩增和基因克隆

Xag 基因组 DNA 和 pET30(+)质粒 DNA 提取

参见文献 [12]。依据黄单胞菌已报道的 *hpa1* 基因序列设计简并引物,两端分别引入 *Nde* I 和 *Kpn* I 酶切位点(下划线标出)。引物序列 P1: 5'-CGAGAAAGCATATGAA(TC)TC(AT)TTGAA(CT)ACACA (GA) (CT) TC-3'; P2: 5'-GAGGTACCTTACTGCAI(TC)GAI(GC)(GA) GC)I(TG)CT)CG-3'。反应体系(50 μ L): 1 μ L *Ex Taq* 酶(1U/ μ L), 1 μ L 25mmol/L dNTP, 2 μ L 20 pmol/L P1 和 2 μ L 20 pmol/L P2, 1 μ L 100 ng/ μ L *Xag* gDNA 和 43 μ L 去离子无菌水。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4min; 94 $^{\circ}$ C 30s 60 $^{\circ}$ C 30s 72 $^{\circ}$ C 30s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 4min。PCR 产物和质粒 DNA 纯化后用 *Nde* I 和 *Kpn* I 双酶切, 1% 低熔点琼脂糖上回收纯化, 连接后转化宿主菌 BL21。LB + Km 20 μ g/mL 的平板上筛选转化子, 经 PCR 扩增和相应双酶切验证后获得基因工程菌株。

1.3 基因表达产物的提取和检测

单菌落基因工程菌接种于 20mL LB 中 37 $^{\circ}$ C 培养 6h, 加 IPTG 至终浓度 1mmol/L 诱导表达 3h 后, 离心收集菌体, 去上清后加 5mmol/L Tris · EDTA (pH8.0) (含终浓度为 0.1mmol/L 的 PMSF) 缓冲液, 于沸水中水浴 5min, 冷却后离心取上清, 即为粗提蛋白(Cell free extracted protein, CFEP)。

蛋白质检测方法参见文献 [12]。CFEP 与 2 \times SDS-PAGE 加样缓冲液等体积混合上样, 17.5% SDS-PAGE 检测, 40mA 恒流电泳 6h, 考马斯亮蓝染色后, BioImage 系统成像和分析基因表达产量。

1.4 HR 反应和 HR 阻断

HR 反应和 HR 阻断分别在普通烟 NC89 和转 *NahG* 的三生烟(本实验室提供)上进行, 测定方法参见文献 [13]。对照 harpin_{Ea} 由 Wei 博士惠赠^[6]。

1.5 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, DNASTar 和 BioEdit 软件进行序列分析。

2 结果和分析

2.1 大豆斑疹病菌 harpin 编码基因的克隆和表达

以 *Xag* 基因组 DNA 为模板, PCR 方法扩增出约 0.4kb 的 DNA 片段, 经与表达载体 pET30a(+) 连接后转化大肠杆菌 BL21, 获得基因重组表达质粒 pHR3 和工程菌 BHR-3(未显示)。经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 分析发现, BHR-3 比宿主菌 BL21 多一条 15.1kD 大小的蛋白质条带(图 1)。这表明, *Xag* 中的 *hpa1* 基因已成功地构建于表达载体 pET30a

(+) 上, 并能在大肠杆菌中表达。

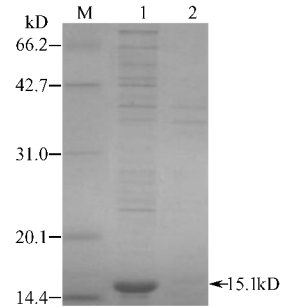


图 1 大豆斑疹病菌 harpin 编码基因表达产物的 SDS-PAGE 检测

Fig.1 SDS-PAGE detection of an harpin protein expressed in *E. coli* BL21 harboring a reconstructed plasmid pHR3
M. Marker; 1. BHR-3; 2. BL21 as control.

2.2 Harpin 编码基因序列分析

序列测定结果显示, 编码 *Xag* 中 harpin 蛋白编码基因 402bp, 编码 133 个氨基酸的蛋白质。该蛋白富含甘氨酸(G), 不含半胱氨酸(C), GGG-GG 基序有 2 个。GenBank 数据库中同源性搜索比较显示, 该 DNA 片段与 Kim 等^[9]报道的 *hpaG* 基因相同, 与 *Xac* 的 *hpa1* 基因^[10]同源性达 93.8%, 与 *Xoo* PXO86 菌株的 *hpa1*^[3]同源性达 72.4%, 与 *Xoo* MAFF301237 菌株的 *hpa1*^[5]同源性达 71.1%, 与 *Xooc* 的 *hpa1* (AY875714, 本实验室) 达 67.5%, 与 *Xcv* 的 *xopA*^[11] 达 61.6%, 与 *Xcc* 的 *hpa1*^[10] 达 51.4%(表 1), 与其它革兰氏阴性植物病原细菌的 harpin 编码基因无同源性。氨基酸序列比较提示, 该基因编码的蛋白质与 Kim 等^[9]报道的 HpaG 相同, 与 *Xac* 的 Hpa^[10] 同源性达 91.7%, 与 *Xoo* PXO86 菌株的 Hpa^[3] 同源性达 59.4%, 与 *Xoo* MAFF301237 菌株的 Hpa^[5] 同源性达 59.4%, 与 *Xooc* 的 HpaK (AY875714, 本实验室) 达 55.6%, 与 *Xcv* 的 XopA^[11] 达 47.9%, 与 *Xcc* 的 Hpa^[10] 达 29.8%(表 1), 与其它革兰氏阴性植物病原细菌的 harpin 蛋白质无同源性。同列比对发现, 植物病原黄单胞细菌的 harpin 蛋白富含甘氨酸(G) 区域是可变区。*Xag* 的 harpin 含 2 个 GGG-GG 基序(motif), 比 *Xoo* PXO86 菌株少 2 个, 比 *Xoo* MAFF301237 菌株少 1 个, *Xcc* 和 *Xcv* 中没有 GGG-GG 基序(图版 I-A)。这表明, *hpa1* 基因位点在不同黄单胞菌中有一定的变化。从图版 I-A 中还可以看出, 水稻黄单胞菌 *hpa1* 基因编码的 harpin 蛋白质存在 1 个半胱氨酸, 而 *Xag* 等其它植物病原黄单胞菌的 harpin 中不存在半胱氨酸残基。

表 1 大豆斑疹病菌 *hpa1* 基因及其蛋白质的同源性比较Table 1 The properties of *hpa1* gene and Hpa1 protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* compared with other plant *Xanthomonas* pathogens

Source of <i>hpa1</i> gene	Gene size/bp	Nucleotide identity /%	Amino acid number	Protein identity/%	Content of Gly/%
<i>Xag</i> *	402	—	133	—	21.1
<i>Xac</i>	414(Xac0416)	93.8	137	91.7	22.6
<i>Xoo</i>	432(BAB07484**)	72.4	143	59.4	26.6
<i>Xoo</i>	420(AB115081)	71.1	139	59.4	24.5
<i>Xooc</i>	414(AY875714)	67.5	137	55.6	21.2
<i>Xcv</i>	354(U33548)	61.6	117	47.9	8.6
<i>Xcc</i>	360(Xcc1240)	51.4	121	29.8	13.2

* *Xag*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*; *Xoo*, *X. oryzae* pv. *oryzae*; *Xooc*, *X. o.* pv. *oryzicola*; *Xac*, *X. axonopodis* pv. *citri*; *Xcc*, *X. campestris* pv. *campestris*; *Xcv*, *X. c.* pv. *vesicatoria*. ** Accession number or Gene ID in GenBank.

2.3 harpin_{Xag} 蛋白的理化特性和生物学功能

基因工程菌 BHR-3 诱导表达后提取的 harpin_{Xag} 蛋白,经 100℃ 处理 10min,仍可在烟草上激发 HR; harpin_{Xag} 经蛋白酶 K(终浓度 20μg/mL)处理,则丧失在烟草上激发 HR 的能力;harpin_{Xag} 经蛋白质稳定剂 PMSF 和蛋白酶 K 处理后,则在烟草上可激发 HR(图版 I-B),表明大豆斑疹病菌 harpin_{Xag} 对热稳定,对蛋白酶 K 敏感。Harpin_{Xag} 蛋白与放线菌素 D(7.1 × 10⁻⁵ mmol/L)、氯化镉(1 × 10⁻³ mmol/L)和环己酰亚胺(1 × 10⁻⁴ mmol/L)分别组合注射烟草,则丧失激发烟草产生 HR 的能力,与对照 Harpin_{Ea} 蛋白相同,提示 harpin_{Xag} 激发烟草产生的 HR 可被 RNA 转录抑制剂放线菌素 D、蛋白合成抑制剂环己酰亚胺以及钙离子通道阻断剂氯化镉所抑制,在 *NahG* 烟草上,harpin_{Xag} 不能激发产生 HR(图版 I-B),表明 harpin_{Xag} 激发烟草产生 HR 需要烟草体内水杨酸的积累。以上提示,Harpin_{Xag} 与革兰氏阴性植物病原细菌中产生的 Harpin 具有相同的理化特性和生物学功能。

3 讨论

革兰氏阴性植物病原细菌在非寄主植物上激发产生 HR 的蛋白是由 *hrp* 基因编码的^[3-9]。本文依据黄单胞菌已报道的 *hpa1* 基因^[3-5,10,11]设计简并引物,用异源基因克隆法从大豆斑疹病菌中克隆了编码 harpin 的基因 *hpa1*(命名为 *hpa1_{Xag}*),并证明该基因产物具有 HR 激发能力。本研究克隆的 *hpa1_{Xag}* 基因与 Kim 等报道的 *hpaG* 基因^[9]相同。从大豆斑疹病菌中克隆和表达 harpin 编码基因,在国内尚属首

次。

植物病原黄单胞细菌 *hpa1* 基因编码的 harpin 蛋白质虽然具有 HR 激活性,但在结构方面还有一定的差异。本文在蛋白质水平上同列比较发现,富含甘氨酸区域是植物病原黄单胞细菌 harpin 蛋白质的可变区域,而且仅有水稻黄单胞菌的 harpin 蛋白质中存在半胱氨酸。植物病原黄单胞细菌 harpin 蛋白质这种结构上的差别与其 HR 激发能力以及在植物上的生物学效应间的内在联系还有待进一步研究。

HR 是植物的抗病反应^[1,2,7]。有证据表明,harpin 类蛋白激发植物产生 HR 是由水杨酸(Salicylic acid, SA)介导的信号传导途径进行的^[7]。SA 介导的信号传导途径是植物产生系统获得抗病性(Systemic acquired resistance, SAR)所需的^[7,14]。本研究将 harpin_{Xag} 注射 *NahG* 烟草叶片,则不能激发 HR。*NahG* 烟是水杨酸羟化酶转基因烟,可阻断烟草中的 SA 积累^[14]。这表明,Harpin_{Xag} 激发 HR 是由水杨酸介导的信号传导途径进行的,可以激发植物产生 SAR。现有研究结果表明,harpin 类蛋白是由植物病原细菌 TTSS 前端的 Hrp pili 分泌的^[15],并且其结合位点是在植物细胞膜上^[8]。目前尚不清楚植物病原黄单胞菌的 harpin 蛋白是否也是作用于植物细胞膜上。基于植物病原细菌 harpin 蛋白质可激发植物产生 SAR,以此为切入点可解析植物-病原物互作的分子机理以及利用 harpin 蛋白开展植物病害防治的潜力,因此,发掘和分离 harpin 类蛋白编码基因已成为科学研究的热点问题。本文从大豆斑疹病菌中克隆和表达了 harpin 编码基因,将为开展水稻黄单胞菌 harpin 蛋白结构与功能分析以及基因药物学设计方面具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 陈功友,邹丽芳,王邢平,等. 水稻白叶枯病菌致病性分子遗传学基础. 中国农业科学 2004 37(9):1301-1307.
- [2] 陈功友,王金生. 植物病原细菌致病性决定因子. 植物病理学报 2002 32(1):1-6.
- [3] Zhu W G, Gbanua M M, White F F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol*, 2000 182:1844-1853.
- [4] 闻伟刚,王金生. 水稻白叶枯病菌 harpin 基因的克隆. 植物病理学报 2001 31(4):295-300.
- [5] Oku T, Tanaka K, Inoue M I Y, et al. Structural conservation of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Gen Plant Pathol*, 2004 70:159-167.

- [6] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, *et al.* Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, **257**, 85 – 88.
- [7] Dong H, Terrence F D, Bauer D W, *et al.* Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J*, 1999, **20** 207 – 215.
- [8] Lee J, Klessig D F, Nurnberger T. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis related gene *hin1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, 2001, **13**: 1079 – 1093.
- [9] Kim J, Park B K, Yoo C, *et al.* Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. *J Bacteriol*, 2003, **11**(10): 3155 – 3166.
- [10] Da Silva A C, Ferro J A, Reinach F C, *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 2002, **417**, 459 – 463.
- [11] Noel L, Thieme F, Nennstiel D, *et al.* Two novel type III -secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol*, 2002, **184** :1340 – 1348.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- [13] 宋从凤, 王金生. 水稻白叶枯病及其毒素引起烟草叶片组织坏死机制的研究. *植物病理学报*, 1999, **29**(1): 57 – 62.
- [14] Delaney T P, Uknes S, Vermooij B, *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 1994, **266**: 1247 – 1250.
- [15] Van Gijsegem F, Vasse J, Camus J C, *et al.* *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol Microbiol*, 2000, **36**: 249 – 260.

Cloning and characterization of an harpin-encoding gene from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* required for hypersensitive response on nonhost plant tobacco

CHEN Gong-you* ZHANG Bing WU Xiao-min ZHAO Mei-qin

(Key Lab for Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Chinese Ministry of Agriculture, Department of Plant Pathology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: An *hpaI* gene was cloned into an expression vector, pET30a(+), from the genomic DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), the causal agent of soybean bacterial pustule, with degenerated primers by polymerase amplification reaction (PCR). The gene product was extracted from the conjugate (BHR-3) of BL21(DE3) with the recombinant vector pHR3 after the engineering strain was induced by IPTG in LB medium. The SDS-PAGE gel showed that the gene product was 15.1 kD. The product was heat-stable (10 min at 100°C), protease K sensitive, and able to trigger hypersensitive response (HR) in common tobacco, but was unable to elicit HR in *NahG* transgenic tobacco in which salicylic acid accumulation was abolished. Moreover, the HR elicitation of the protein in tobacco was dispelled by eukaryotic metabolic inhibitors, actinomycin D, cycloheximide and LaCl₃. The 402 bp *hpaI* gene in this study putatively encoded a 133 ammonia acid protein of which glycine (G) was rich with 21.1%. Sequence comparison indicated that the *hpaI* gene and its protein was 51.4% ~ 93.8% identity with those of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and other *Xanthomonas* species and pathovars. Alignments of harpin proteins of *Xanthomonas* genus displayed that the glycine-rich region with GGG-GG motif was variable. The comparison also showed that the harpin-encoding gene of *Xag* (nominated here as *hpaI_{Xag}*) did not possess any similarity with that of *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum* at nucleotide and protein levels. It is concluded that *hpaI_{Xag}* gene encodes an harpin protein which elicits a typical HR in nonhost tobacco.

Key words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, Tobacco, Hypersensitive response, Harpin-encoding gene

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2004AA214093); Jiangsu Scientific and Technological Project (BE2002303); Jiangsu Key Project in Basic Natural Science (BK2001207)

* Corresponding author. Tel 86-25-84399092; Fax 86-25-84395246; E-mail: gyouchen@njau.edu.cn

Received date: 12-06-2004