

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(11):116–1171; 4 November 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

c-di-GMP 抑制转录调控因子 Clpxoo 与葡聚糖酶基因启动子的结合

李波[#], 田芳[#], 陈华民, 吴茂森, 何晨阳^{*}

中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

摘要: 【目的】阐明水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) c-di-GMP 信号受体和转录调控因子 Clpxoo 对葡聚糖酶基因 (*engA_{xoo}*) 的转录调控作用机制。【方法】通过基因表达载体的构建和转化、蛋白诱导表达及其 Ni-NTA Resin 亲和层析, 进行了 *clpxoo* 基因的原核表达和产物纯化。通过荧光素 (FAM) 探针标记和凝胶阻滞试验 (EMSA) 对 Clpxoo 纯化蛋白与葡聚糖酶基因启动子 (*engA_{xoo}-p*) 的结合活性及其 c-di-GMP 信号分子的抑制作用进行了测定分析。【结果】在优化的诱导表达和纯化条件下, 成功地获得了 Clpxoo 纯化蛋白。Clpxoo 可与 *engA_{xoo}-p* 序列发生阻滞现象, 表明它具有与启动子特异性结合的活性。在反应体系中加入 c-di-GMP 可导致结合作用的消除。【结论】Clpxoo 接受 c-di-GMP 信号后, 可能通过构象的改变, 从而与 *engA_{xoo}-p* 的结合活性受到抑制; 优化的 Clpxoo 蛋白纯化和 EMSA 方法可以用于后续的调控元大规模鉴定的研究。

关键词: 水稻白叶枯病菌, c-di-GMP, 信号受体蛋白, 启动子, 结合作用

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1166-06

Clp (cyclic AMP receptor like protein) 蛋白是病原黄单胞菌重要的全局转录调控因子之一^[1-2]。其 N 端 cNMP 结合结构域可以作为第二信使环二鸟苷酸 (cyclic diguanylate, c-di-GMP) 信号受体结构域^[3], C 端保守的 DNA 结合结构域 (HTH) 可以识别和结合靶基因 [如甘蓝黑腐病菌葡聚糖酶基因 (*engXCA*)] 启动子序列^[4], HTH 结构域是 Crp-Fnr (cyclic AMP receptor protein-fumarate and nitrate reduction regulator) 家族蛋白转录调控因子的典型特征^[5], 当它与 DNA 结合时不需要其它的小分子等做配基^[1]。

Clp 通过实现对下游基因表达的控制, 从而调控了细菌毒性因子产生、运动性、胞外多糖合成、生物膜形成等诸多生理功能^[6]。

水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) *clp* 基因 (Xoo 测序菌株 PXO99^A 基因组序号: PXO_04006) 缺失突变导致了病菌运动性、胞外多糖产生和 H₂O₂ 抗性显著降低^[7], 表明 Clpxoo 可能作为一个信号受体和全局转录调控因子, 在 Xoo 中介导了 c-di-GMP 信号途径及其对上述生理、生化功能的调控。然而, Clpxoo 是否以及如何

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31100947), 国家“973 项目” (2011CB100701)

^{*} 通信作者。Tel: +86-40-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

作者简介: [#]共同第一作者。李波 (1988 -), 男, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理学, E-mail: zhibao1ibo@163.com; 田芳 (1979 -), 女, 山西晋城人, 助理研究员, 研究方向为分子植物病理学, E-mail: ftian@ippcaas.cn

收稿日期: 2013-04-07; **修回日期:** 2013-06-03

对 Xoo 基因表达的调控作用机理尚有待阐明。本实验室正在运用 ChIP-Seq (Chromatin Immunoprecipitation and high-throughput sequencing) 方法, 鉴定受 Clpxoo 直接调控的基因网络或调控元(另文报导)。

作为上述研究的基础工作, 本研究首先进行了 Clpxoo 原核诱导表达、产物提纯及其与 *engAxoo* 基因(Xoo 测序菌株 PXO99^A 基因组序号: PXO_04151) 启动子片段的结合活性测定; 同时对 Clpxoo 蛋白诱导表达条件和 EMSA 探针标记法进行了优化和改进。发现 Clpxoo 具有与 *engAxoo-p* 序列特异性结合的活性, 这种结合作用受到 c-di-GMP 分子的抑制; Clpxoo 纯化蛋白可以用于后续的调控元鉴定研究。本文报道这一方面的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒及培养条件: Xoo 菌株 PXO99^A 由本实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 和 BL21 (康为世纪生物公司); 克隆质粒 pMD18-T (TaKaRa 公司); 表达载体 pCold-SUMO (哈尔滨海基生物公司)。Xoo 培养基: PSA 固体培养基 (蛋白胨 10 g/L, 蔗糖 10 g/L, 谷氨酸 1 g/L, 琼脂粉 15 g/L); M210 液体培养基 (酶水解干酪素 8 g/L, 蔗糖 5 g/L, 酵母提取物 4 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L); *E. coli* 培养液为 LB 培养基, 液体与固体的 LB 培养基在使用前加入终浓度 100 μ g/mL 的 Amp 抗生素。

1.1.2 主要试剂和仪器: TaqTM DNA 聚合酶、T4

DNA Ligase 和各种限制性内切酶 (TaKaRa 公司), TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、SuperScriptTM III Reverse Transcriptase、RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen)、荧光实时定量试剂盒 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)、细菌基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、核酸和蛋白 marker、小鼠单克隆抗体一抗 (Anti-His antibody) 和辣根过氧化物酶偶联的羊抗小鼠二抗 (IgG-HRP) (北京天根生化科技有限公司), Super ECL Plus 超敏发光液 (华兴博创生物技术中心), isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) 和蛋白纯化 Ni SepharoseTM 填料 (哈尔滨海基生物公司), Western Blotting 其余试剂 (北京化工厂国产分析纯药品), 超声破碎仪 VCX750 (Sonic 公司), 酶标仪 (Thermo 公司), PCR 仪、电泳仪和转膜仪 (Bio-Rod 公司), ImageQuant LAS 4000 mini 超敏化学发光成像仪和激光扫描成像仪 Typhoon 9410 (GE 公司), 荧光素标记引物 (上海生工生物工程公司)。

1.2 基因克隆

按照试剂盒说明书方法进行 Xoo 基因组 DNA 提取。用 primer premier 5.0 软件设计特异引物 *clpxoo-F/R* (表 1), 以 PXO99^A 基因组为模板, 在 PCR 反应条件 (95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min) 下, 扩增 *clpxoo* 全长基因。进行 1% 琼脂糖凝胶检测、PCR 产物回收纯化。与 pMD18-T 载体在 16 $^{\circ}$ C 下连接反应 8 h 后, 通过热击法将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。提取质粒进行酶切验证, 获得的阳性质粒 pMD18-T-*clpxoo* 进行测序确证 (北京华大基因生物公司)。

表 1. 引物

Table 1. The primers used in this study

Name	Sequence (5'→3') and artificial restriction enzyme site (underlined)
<i>clpxoo-F</i>	TCCGATCCATGAGCTCAGCAAACACG (<i>Bam</i> HI)
<i>clpxoo-R</i>	TCAAGCTTTTATAGCGCGTGCCGTACAGCAC (<i>Hind</i> III)
<i>engAxoo-p-F</i> (FAM)	FAM-ATCTTGCTCTTCGGCTGC
<i>engAxoo-p-R</i> (FAM)	FAM-GGGACACTCCGAAACAG
<i>engAxoo-p-F</i>	ATCTTGCTCTTCGGCTGC
<i>engAxoo-p-R</i>	GGGACACTCCGAAACAG
PXO_04151-420bp-F	TCCGATCCATGAGCTCAGCAAACACG (<i>Bam</i> HI)
PXO_04151-420bp-R	TCAAGCTTTTACTGAACACCGATCGCAT (<i>Hind</i> III)

1.3 重组表达载体的构建和转化

按照文献 [8] 的方法进行重组表达载体的构建

和转化。用 *Bam*HI 和 *Hind*III 限制性内切酶分别对表达载体 pCold-SUMO 和 pMD18-T-*clpxoo* 质粒进行

双酶切。回收酶切产物,将回收后的表达载体和目的基因片段用 T4 DNA Ligase 在 16℃ 的条件下连接过夜,通过热击法将连接产物转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,涂布 Amp 抗性平板,对筛选的转化子进行质粒提取、酶切和测序验证,得到阳性克隆 pCold-SUMO-clpxoo。

1.4 蛋白表达、纯化和验证

按照文献 [8] 的方法进行蛋白表达。通过调整菌液培养浓度、IPTG 浓度、诱导温度和时间,对可溶性蛋白诱导表达条件进行了优化。挑取 *E. coli* BL21 (pCold-SUMO-clpxoo) 菌落接种 LB (100 μg/mL Amp) 培养基,37℃ 200 r/min 剧烈振荡培养至 OD_{600} 为 0.6 - 0.8。将培养液冷却至 15℃,静置 30 min,加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG,在 15℃ 下诱导 24 h。离心 (4000 × g, 15 min, 室温) 收集菌体,重悬细胞,置于冰上进行超声破碎 5 min,离心 (10000 × g, 30 min, 4℃) 取上清,经 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色,检测蛋白的表达。

按照试剂盒说明书进行蛋白纯化。用 His 标签蛋白纯化树脂镍柱 (Ni-NTA Resin) 纯化蛋白。

按照文献 [9] 的方法进行蛋白 Western blotting 验证。将纯化蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,通过半干式转移到 PVDF 膜上;加入 5% 脱脂牛奶作为包被液封闭非特异性位点,在室温下 50 r/min 平稳摇动 2 h 后,加入 Anti-His 一抗 (1:1000, 0.01 mol/L PBS 稀释) (阴性对照 1% BSA),在 4℃ 下静置 12 h,弃一抗加 IgG-HRP 二抗 (1:5000, 0.01 mol/L PBS 稀释),在室温下平稳摇动 2 h 后,弃二抗,加入 Super ECL Plus 超敏发光显色液,通过化学发光成像仪观察结果。

1.5 羧基荧光素 (FAM) 标记启动子探针的合成

按照文献 [10 - 11] 的方法进行启动子探针标记。选择 *engAxoo* 基因上游 250 bp 碱基序列作为启动子区,设计探针引物 *engAxoo-p-F/R* (FAM) (表 1);在 5' 端添加一个活泼的氨基后,与 FAM-NHSester 反应,得到 5' 端标记 FAM 的引物。用特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增,得到荧光素标记探针;回收纯化后,测定探针浓度。对照分别为未标记荧光素探针的竞争性探针对照引物 *engAxoo-p-F/engAxoo-p-R* 和扩增 *engAxoo* 基因编码区 420 bp 片段的非竞争性阴性对照引物 PXO_04151-420bp-F/R。所有引物均由上海生工生物有限公司合成。

1.6 EMSA 实验

按照文献 [12] 的方法进行 EMSA 实验。在 20 μL EMSA 体系中,加入 ddH₂O、2 μL EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液 (10 ×)、Clpxoo 纯化蛋白,室温下避光静置 10 min;加入 5 μL FAM 标记的核酸探针,混匀,静置 30 min;加入 2 μL EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (10 ×),混匀,将样品点入 4% 非变性胶孔内,用 0.5 × TBE 作为电泳液,在温度不超过 25℃ 条件下电泳 1 h 后,将 EMSA/Gel-Shift 非变性胶置于激光扫描成像仪下,观察结果。

2 结果

2.1 clpxoo 基因克隆、原核表达和产物纯化

2.1.1 表达载体的构建、转化和诱导表达:用特异性引物 *clpxoo-F/R* 对 *Xoo* 菌株 PXO99^A 基因组进行 PCR 扩增,成功地获得 690 bp 大小的 *clpxoo* 基因片段。将克隆片段进行测序,发现其序列与 GenBank 中提供的基因序列完全一致。生物信息学分析表明,Clpxoo 由 230 个氨基酸组成,其 N 端具有环化核苷酸结合结构域 (cNMP),C 端具有 DNA 结合结构域 (HTH)。

将测序正确的全长基因定向克隆至表达载体 pClod-SUMO 中,得到重组表达质粒 pClodSUMO-clpxoo。经 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切验证,得到大小约为 700 bp 的片段,与预期结果一致 (图 1-A)。将重组质粒转化至 *E. coli* 表达菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞中,在优化的诱导表达条件 (在菌液浓度 OD_{600} = 0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG、15℃ 下诱导 16 h) 下,得到了大小为 45 kDa 的融合蛋白 (Clpxoo 加上 N 端的 SUMO 和 His₆ 标签),以可溶形式在上清中大量表达 (图 1-B)。

2.1.2 蛋白的纯化和验证:用不同浓度的咪唑缓冲液对镍柱蛋白进行洗脱,发现使用 200 mmol/L 咪唑洗脱效率高,可获得纯度可达 90% 以上的可溶性蛋白 (图 2),经过 Bradford 法测定蛋白浓度约为 3 mg/mL。

将不同浓度的 Clpxoo 纯化蛋白进行 Western 印迹验证,结果显示在分子量大小为 45 kDa 处出现特异性条带 (图 3),表明了 Clpxoo 在 *E. coli* 中的表达正确。

2.2 Clpxoo 与 *engAxoo-p* 结合活性的检测

2.2.1 *engAxoo-p* 探针荧光标记:*engAxoo* 与

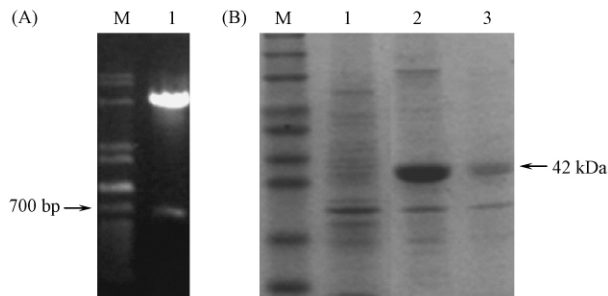


图 1. *clpxoo* 基因原核表达载体酶切验证和蛋白诱导

Figure 1. Verification and induction of *clpxoo* expression vector. A: The plasmid for *clpxoo* gene expression was confirmed by restriction enzyme digestion. M: 1 kb plus DNA Ladder; lane 1: pColdSUMO-*clpxoo* was digested with *Bam*HI and *Hind*III. B: Protein expression induced by IPTG in BL21 (DE3) (pColdSUMO-*clpxoo*). M: protein marker; lane 1: non-induction control; lane 2: supernatant from cell lysis after IPTG induction; lane 3: precipitant from cell lysis after IPTG induction.

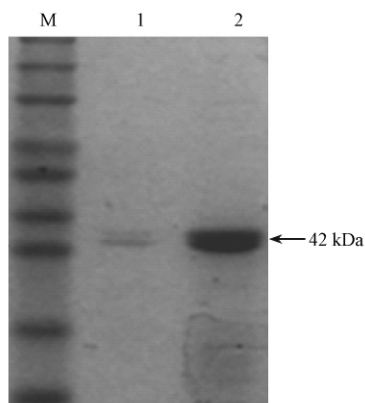


图 2. Clpxoo 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of purified Clpxoo fusion protein by Ni-NTA resin. M: protein marker; lane 1: elution with 100 mmol/L imidazole; lane 2: elution with 200 mmol/L imidazole.

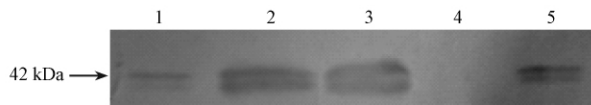


图 3. Clpxoo 纯化蛋白 Western Blotting 验证

Figure 3. Confirmation of purified Clpxoo protein by western blotting. Lane 1: 40 ng Clpxoo; lane 2: 80 ng Clpxoo; lane 3: 160 ng Clpxoo; lane 4: negative control; lane 5: positive control.

engXCA 基因序列同源性高达 80% 以上, 启动子序列同源性为 71%, 推测 *engAxoo* 可能是 Clpxoo 靶基因。预测与 Clpxoo 特异识别位点序列为 5'-TTCTGTGGACACCTTCACGCCA-3', 位于转录起始位点 -94 到 -73 bp 位置。用 5'-FAM 荧光素标记的

特异性引物进行 PCR 合成探针 (139 bp)、产物纯化、凝胶电泳检测, 获得了 800 nmol/L 探针。

2.2.2 Clpxoo 与 *engAxoo-p* 结合作用的 EMSA 分析

优化了 EMSA 反应体系 (20 μ L): 其中蛋白摩尔量比探针 = (5 - 10): 1, 蛋白含量约为 1 μ mol/L、探针约为 200 nmol/L。在此体系中, 发现 Clpxoo 蛋白与荧光探针发生了结合作用, 阻滞了探针迁移; 在无 Clpxoo 的对照中, 未发现探针迁移阻滞现象。在上述体系中加入非标记探针时, 发现 Clpxoo 对荧光探针的迁移阻滞作用消失, 表明非标记探针通过竞争性反应, 抑制了荧光探针与 Clpxoo 的结合作用。表明 Clpxoo 蛋白具有与 *engAxoo-p* 特异性结合的活性 (图 4)。

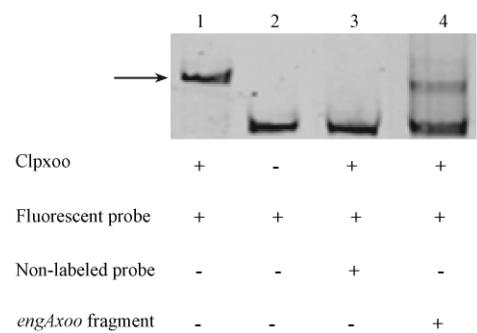


图 4. Clpxoo 与 *engAxoo-p* 结合活性的 EMSA 检测

Figure 4. EMSA of Clpxoo with *engAxoo-p*. Lane 1: Binding reaction, 800 ng Clpxoo + 360 ng fluorescent probes; lane 2: CK, 360 ng fluorescent probes; lane 3: Competitive assay, 800 ng Clpxoo + 360 ng fluorescent probes + 360 μ g non-labeled probes; lane 4: Noncompetitive reaction, 800 ng Clpxoo + 360 ng fluorescent probes + 360 μ g *engAxoo* gene fragments (420 bp). The arrow indicates the position of the band shift.

用不同浓度的 Clpxoo 蛋白与荧光探针进行反应, 发现两者结合呈现梯度现象, 表明结合作用具有特异性。此外, 当反应体系中加入终浓度 20 μ mol/L 的 c-di-GMP 时, 探针迁移阻滞作用完全消失, 表明 c-di-GMP 抑制了 Clpxoo 与 *engAxoo-p* 的结合作用 (图 5)。

3 讨论

前期研究表明, Clpxoo 介导了 c-di-GMP 信号途径及其对 Xoo 细胞功能的调控^[7]。为了进一步阐明 Clpxoo 作为一个信号受体和转录调控因子对基因表达的调控机理, 本研究首先通过基因克隆、原核

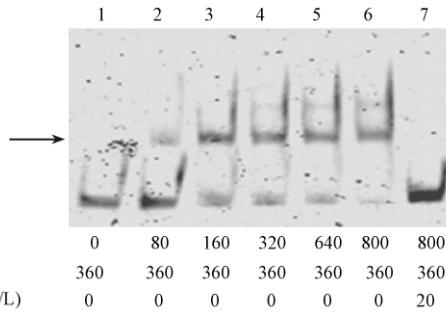


图 5. 不同浓度的 Clpxoo 蛋白与 *engAxoo-p* 结合及其受 c-di-GMP 抑制的 EMSA 检测

Figure 5. EMSA of different concentrations of Clpxoo protein and *engAxoo-p*, and c-di-GMP inhibited their interaction. The arrow indicates the band shift.

表达载体构建和转化、蛋白诱导表达、表达产物纯化和验证,在优化的诱导表达和纯化条件下,成功地获得了大量的 Clpxoo 蛋白,为后续的调控元鉴定和基因表达调控机理的研究奠定了基础。

通过 EMSA 分析,发现 Clpxoo 具有与 *engAxoo-p* 启动子结合的活性,而 c-di-GMP 信号分子可解除这种结合作用。表明 c-di-GMP 可以通过 Clpxoo 对 *engAxoo-p* 结合作用进行抑制,实现对 *engAxoo* 基因表达的控制。推测可能的机制是, c-di-GMP 被 Clpxoo 的信号受体结构域识别和接受后,该复合体可能通过构象的改变,促使其 HTH 结构域与靶 DNA 结合作用受到抑制。这一结果揭示了在 Xoo 中存在的 c-di-GMP-Clpxoo-靶基因之间的一种信号传导机制和基因表达调控的模式。

实验中对 EMSA 探针标记方法进行了改进,利用 FAM 荧光素探针标记法代替传统的同位素或者生物素标记法^[11]。荧光素标记法简便、操作安全;不需要同位素标记对蛋白胶进行转膜压片曝光等处理,也不需要生物素标记对蛋白胶进行二次转膜、HRP 抗体孵育等处理,简化了实验程序和步骤,大大缩短了试验时间,同时排除蛋白胶转膜等过程中带来的假阳性或者信号丢失的可能性。在 -20℃ 下标记引物至少可保存半年、合成探针可保存 2 个月(实验室资料),确保了实验时间。因此,将 FAM 探针标记法成功用于 EMSA 实验,为 DNA-蛋白质分子互作研究提供了一种简便、安全、灵敏、易检测的新方法。

参考文献

[1] Chin KH, Lee YC, Tu ZL, Chen CH, Tseng YH, Yang

JM, Ryan RP, McCarthy Y, Dow JM, Wang AH, Chou SH. The cAMP receptor-like protein Clp is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 396(3): 646-662.

- [2] Tao F, He YW, Wu DH, Swarup S, Zhang LH. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(4): 1020-1029.
- [3] Leduc JL, Roberts GP. Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(22): 7121-7122.
- [4] Hsiao YM, Liao HY, Lee MC, Yang TC, Tseng YH. Clp upregulates transcription of *engA* gene encoding a virulence factor in *Xanthomonas campestris* by direct binding to the upstream tandem Clp sites. *FEBS Letters*, 2005, 579(17): 3525-3533.
- [5] Matsui M, Tomita M, Kanai A. Comprehensive computational analysis of bacterial CRP/FNR superfamily and its target motifs reveals stepwise evolution of transcriptional networks. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(2): 267-282.
- [6] He YW, Xu M, Lin K, Ng YJ, Wen CM, Wang LH, Liu ZD, Zhang HB, Dong YH, Dow JM, Zhang LH. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(2): 610-622.
- [7] Guan W, Wu M, He C. Molecular identification and functional analysis of Clpxoo, a homologue to the nucleotide receptor protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(1): 32-37. (in Chinese)
管文静,吴茂森,何晨阳.水稻白叶枯病菌核苷酸信号受体蛋白 Clpxoo 的分子鉴定及其功能. *微生物学报*, 2009, 49(1): 32-37.
- [8] Yang F, Tian F, Sun L, Chen H, Wu M, Yang CH, He C. A novel two-component system PdeK/PdeR regulates c-di-GMP turnover and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(10): 1361-1369.
- [9] Jensen EC. The basics of western blotting. *Anatomical Record*, 2012, 295(3): 369-371.

- [10] Pagano JM, Clingman CC, Ryder SP. Quantitative approaches to monitor protein-nucleic acid interactions using fluorescent probes. *RNA*, 2011, 17(1): 14-20.
- [11] Wang K, Gao Y, Peng X, Yang G, Gao F, Li S, Zhu Y. Using FAM labeled DNA oligos to do RNA electrophoretic mobility shift assay. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(6): 2871-2875.
- [12] Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2007, 2(8): 1849-1861.

Binding of transcription regulator Clpxoo to promoter of endoglucanase gene *engA_{xoo}* was inhibited by c-di-GMP in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Bo Li[#], Fang Tian[#], Huamin Chen, Maosen Wu, Chenyang He^{*}

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193

Abstract: [Objective] To understand the regulatory mechanism by cyclic diguanylate (c-di-GMP) receptor and transcriptional regulator Clpxoo of expression of endoglucanase gene (*engA_{xoo}*) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen of rice. [Methods] A plasmid to express *clpxoo* gene was constructed and transformed into *Escherichia coli* for expression by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) induction. The recombinant protein was purified by Ni-NTA resin. The binding affinity between purified Clpxoo protein and the promoter of endoglucanase gene (*engA_{xoo}-p*) was determined by electrophoretic mobility shift assay using fluorescein (FAM)-labeled probes. The role of c-di-GMP on the binding was also examined. [Results] Under the optimized conditions, Clpxoo was expressed and purified successfully. Mobility shift of *engA_{xoo}-p* in the presence of Clpxoo was observed, indicating that specific binding occurred between them. Moreover, addition of c-di-GMP molecules in the above reaction system abolished such binding. [Conclusion] Once interacting with the signal molecule c-di-GMP, Clpxoo conformational structure may change substantially, which results in inhibition of binding to *engA_{xoo}-p*; The optimized methods for Clpxoo protein purification and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) can be used for subsequent identification of Clp regulon in a larger scale.

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, cyclic diguanylate, signal receptor, promoter, binding

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100947) and by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB100701)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-10-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

[#] These authors contributed equally to this work.

Received: 7 April 2013 / Revised: 3 June 2013