

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :159 – 166; 4 February 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.02.004

十字花科黑腐病菌 III 型效应物基因 *avrAC*_{Xcc8004} 推测的启动子区

蒋国风^{1,2}, 吴秋菊³, 梁晓夏^{2,3}, 杨丽超³, 阳丽艳³, 王凇³, 吴小建³, 姜伯乐^{2,3*}

¹广西大学林学院, 广西 南宁 530004

²亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

³广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004

摘要:【目的】十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*), 能侵染所有十字花科植物, 引起黑腐病。 *Xcc* 通过 III 型分泌系统 (Type III Secretion System, T3SS) 将 III 型效应物 (T3SS effector, T3SE) 蛋白直接转运到植物细胞内, T3SEs 对于病原菌致病性至关重要。许多已鉴定的 T3SEs 基因的启动子区都存在植物诱导启动子盒 (Plant-inducible promoter, PIP-box) 和 -10 box, 但 PIP-box 及 -10 box 与经典的启动子 -10 区及 -35 区之间的关系如何未见报道, -10 box 的序列保守性如何也未见报道。本研究旨在对 T3SE 基因 *avrAC*_{Xcc8004} 推测的启动子区进行研究。【方法】首先, 通过 5'RACE 确定其转录起始位点, 接着用 Fusion PCR 对 -10 box TACGTT 序列中倒数第二个碱基 T 进行点突变为 A/C/G, 即: TACGAT、TACGCT 和 TACGGT, 构建 GUS 融合报告菌株, 定量测定 GUS 酶活。【结果】5'RACE 结果显示 *avrAC*_{Xcc8004} 的转录起始位点为 A, 对比分析得到启动子的 -35 区位于 PIP-box 之后 8 bp 处, 而 -10 区与 -10 box 重叠; *avrAC*_{Xcc8004} 启动子区的 PIP-box 和 -35 区、-10 box 的整个模体为: TTCAC-N₁₅-TTCGC-N₈-TTGATG-N₁₈-TACGTT。最后, GUS 定量测定结果表明, 突变为 C 时 (TACGCT) 的菌株的 GUS 酶活最高, 突变为 G 时 (TACGGT) 的酶活增高最少。在 Δ hrpX 和 Δ hrpG 中的 GUS 酶活均比在 *Xcc* 8004 中有显著的降低。【结论】*Xcc* 的 T3SE 基因 PIP-box 与 -35 区前后相衔, -10 box 即 -10 区, -10 box 对于 *avrAC*_{Xcc8004} 的转录活性有较大的影响, -10 box 突变前后 *avrAC*_{Xcc8004} 均受 HrpG 和 HrpX 正向调控。

关键词: 十字花科黑腐病菌, III 型效应物, HrpX, *avrAC*_{Xcc8004}, PIP-box, -10 box

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 01-0159-08

十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 能侵染所有十字花科植物, 引起黑腐病。该菌是农作物重要病原菌, 也是研究植物病原细菌与植物相互作用机理的模式细菌之一^[1]。*Xcc* 通过 III 型分泌系统 (Type III Secretion System,

T3SS) 将 III 型效应物 (T3SS effector, T3SE) 蛋白直接转运到植物细胞内, 在病原菌和寄主的相互作用中发挥重要的作用。T3SE 通过干扰或调节寄主的正常生理活动, 对付寄主的防御系统, 并从宿主细胞释放养分, 在病原菌的增殖和致病过程中起着至关

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2010GXNSFB013020)

* 通信作者。E-mail: jbl1971@gxu.edu.cn

作者简介: 蒋国风 (1982 -), 女, 广西桂林人, 博士, 主要从事植物生理生态学和植物病理学研究。E-mail: jianggf@mail.ustc.edu.cn

收稿日期: 2013-05-20; 修回日期: 2013-09-06

重要的作用^[2]。T3SS 由 *hrp* 基因簇编码。根据组织性与调控的相似性将 *hrp* 基因簇分成了两种类型的调控网络模式: 第一类是由选择性 σ 因子所调控, 包括欧文氏菌和假单胞菌的致病变种; 另一类是由类 AraC 蛋白激活的, 包括茄科罗尔斯通氏菌和黄单胞菌的致病变种^[3]。*hrpG* 和 *hrpX* 是黄单胞菌最关键的调控基因, 位于 *hrp* 基因簇的旁侧^[4]。HrpG 是一个隶属 OmpR 家族的双组分系统反应调控蛋白, 含有 N-端感受功能域及 C-端 DNA-binding 基序^[5-6]。HrpG 调控 *hrpX*, HrpX 是一个类 AraC 家族的转录激活子, 推测其以双体蛋白的形式存在。它调控包括 *hrp* 基因簇调控单元 *hrpA* 到 *hrpF* 在内的大多数 HrpG 调控元基因的表达^[7-8]。

在很多 HrpX 调控元基因的启动子区都存在两个顺式元件 (*cis*-元件): 一个是植物诱导启动子盒 (Plant-inducible promoter, PIP-box), 另一个位于 PIP-box 下游 30-32 bp 的 -10 box 的序列。许多已鉴定的 T3SEs 基因的启动子区都存在 PIP-box。在辣椒斑点病菌 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) 中首先发现了 PIP-box, 推测它可能与 *hrpB* 的转录活性有关^[9]。PIP-box 是由 25 个碱基序列组成, 两端各为一个保守序列 TTCGC, 中间 15 个序列是可变的碱基, 最初的表示形式为 TTCGC-N₁₅-TTCGC^[9], 位于启动子区的前面。后来发现, 不同来源的植物病原细菌中, 保守的 TTCGC 序列也是不同的。于是, 就将最初发现的 TTCGB-N₁₅-TTCGB (其中 B 代表 G、T 或 C) 表现形式称为严谨的 PIP box (perfect PIP), 而将后面发现的, TTCGB 中个别碱基有变化的 PIP 以及在两个保守序列之间的发生可变碱基和数目的 PIP, 统称为不严谨的 PIP-box (imperfect PIP)^[9-11]。在茄科罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 中, 与 PIP-box 相似的植物可诱导的启动子的保守序列 TTCG-N₁₆-TTGC, 被命名为 *hrpII*-box^[12]。假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 中的序列为 GGAACC-N_{15/16}-CCACNNA, 这个序列起初是在无毒基因中被鉴定, 被命名为 *hrp*-box 或 *avr*-box^[13]。*hrp*-box 可分为关键核苷酸和非关键核苷酸, -35 区的 5 个核苷酸 (GGAAC) 和 -10 区的 3 个核苷酸 (ACNNA) 是关键的核苷酸, 其他核苷酸和中间可变核苷酸数目对启动子的强度起到了非常重要的作用^[14]。单个突变 PIP-box 或者 *hrpII*-box 的保守序列会使启动子的活性降低, 而改变两个保守序列之间

的距离后, HrpX/B 将不再识别该序列^[10,12]。可见, 保守序列之间的碱基序列的数目是非常保守的。在水稻白叶枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 中, 将 *hrpC* 启动子的 PIP-box 保守序列 TTCGB 分别进行点突变和双突变, 发现碱基突变后, 除了中间 C 外, 其余所有位置单个碱基的突变都会导致启动子活性降低到 10% - 30%^[10]。有趣的是, 将最后一个位置的碱基 C 突变为 T 和 C 突变为 G 后, 可使启动子活性最大降低到 50%, 而 C 突变为 A 时, 启动子的活性则受到抑制^[10]。不同的碱基突变, 启动子的 GUS 酶活有不同的降低。但是, 在一些情况下, 甚至在不严谨的 PIP-box 中, 突变掉两个碱基后, 还能保留 20% 的 GUS 活性^[10]。

另外, 在 PIP-box 后 30-32 bp 处还存在的一个顺式作用元件 -10 box (YANNRT), 其中 R 代表 A 或 G, 对启动子的转录活性也起到重要作用^[12]。用类似 PIP-box 的序列和类似 -10 box 的序列 TTCGB-N₁₅-TTCGB-N₃₀₋₃₂-YANNRT, 其中 B 代表 G、T 或 C, Y 代表 C 或 T, D 代表 A、G 或 T, 对水稻白叶枯致病病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 的全基因组搜索新的 HrpXo 调控基因, 连接 GUS 报告基因, 在 15 个候选基因中发现有 9 个基因都依赖 HrpXo 表达, 点突变表明, 这两个模体 (PIP-box 的序列和 -10 box) 对于基因的表达是必须的^[15]。在 *R. solanacearum* 中, *hrpII*-box 与 -10 box 的模体为 TTCGB-N₁₅-TTCGB-N₃₀₋₃₂-YANNRT, 其中 B 代表 G、T 或 C, Y 代表 C 或 T, R 代表 A 或 G^[12]。

经典的启动子 -10 区模体为 T₈₀A₉₅T₄₅A₆₀A₅₀T₉₆, -35 区模体为: T₈₂T₈₄G₇₈A₆₅C₅₄A₄₅, 两模体相隔 15-20 bp, 其中下标数字为该碱基出现的频率。黄单胞菌的 PIP-box (TTCGB-N₁₅-TTCGB) 及 -10 box 与经典的启动子 -10 区及 -35 区之间的关系如何未见报道, -10 box 的序列保守性如何也未见报道。

随着效应物鉴定的迅速发展, 越来越多的 T3SE 相继被报道出来, 其中鉴定到寄主靶标的效应物也有很多^[16-17]。由十字花科黑腐病菌 XC1553 编码的 LRR (leucin-rich repeat protein) 蛋白已被鉴定为具有拟南芥 Col-0 生态型维管束组织特异性的无毒蛋白 AvrAC_{Xcc8004}^[18]。本研究通过 5' RACE 技术确定 XC1553 基因的转录起始位点, 找出启动子区的保守序列, 用 Fusion PCR 技术定点突变其 -10 box 中碱基, 研究 HrpX 与 PIP-box 的相互作用。这将对

阐明植物病原细菌的 *hrp* 调控机制、致病分子机制奠定基础, 为寻找有效的药物靶标具有重要理论意义。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

本工作所用的菌株及质粒见表 1。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的培养基为 LB (Lysogeny Broth), 培养温度为 37°C^[19], 十字花科黑腐病菌的培养温

度为 28°C, 培养基为 NYG (Nutrient Yeast Glycerol)^[20] 或 XCM2 (20 mmol/L succinic acid, 0.15 g/L casamino acids, 7.57 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.011 mmol/L MgSO₄, 60.34 mmol/L K₂HPO₄, 33.07 mmol/L KH₂PO₄, pH 6.6)。抗生素用量为氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 100 mg/L, 四环素 (Tetracycline, Tc) 大肠杆菌用量为 15 mg/L, *Xcc* 用量为 5 mg/L, 利福平 (Rifampicin, Rif) 50 mg/L, 卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 25 μg/mL。

表 1. 本研究的菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| strains or plasmids | relevant characteristics | source or reference |
|-----------------------------|---|----------------------|
| strains | | |
| <i>Xcc</i> 8004 | wild type strain, Rif ^r | [20] |
| Δ <i>hrpG</i> | <i>hrpG</i> mutant of <i>Xcc</i> 8004, Rif ^r , Kan ^r | our lab's collection |
| Δ <i>hrpX</i> | <i>hrpX</i> mutant of <i>Xcc</i> 8004, Rif ^r , Kan ^r | our lab's collection |
| 8004/pLGUS1553 | <i>Xcc</i> 8004 harboring plasmid pLGUS1553, Rif ^r , Tc ^r | this work |
| 8004/pLGUS1553T-A | <i>Xcc</i> 8004 harboring plasmid pLGUS1553T-A, Rif ^r , Tc ^r | this work |
| 8004/pLGUS1553T-C | <i>Xcc</i> 8004 harboring plasmid pLGUS1553T-C, Rif ^r , Tc ^r | this work |
| 8004/pLGUS1553T-G | <i>Xcc</i> 8004 harboring plasmid pLGUS1553T-G, Rif ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpG</i> /pLGUS1553 | Δ <i>hrpG</i> harboring pLGUS1553, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpG</i> /pLGUS1553T-A | Δ <i>hrpG</i> harboring pLGUS1553T-A, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpG</i> /pLGUS1553T-C | Δ <i>hrpG</i> harboring pLGUS1553T-C, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpG</i> /pLGUS1553T-G | Δ <i>hrpG</i> harboring pLGUS1553T-G, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpX</i> /pLGUS1553 | Δ <i>hrpX</i> harboring pLGUS1553, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpX</i> /pLGUS1553T-A | Δ <i>hrpX</i> harboring pLGUS1553T-A, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpX</i> /pLGUS1553T-C | Δ <i>hrpX</i> harboring pLGUS1553T-C, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| Δ <i>hrpX</i> /pLGUS1553T-G | Δ <i>hrpX</i> harboring pLGUS1553T-G, Rif ^r , Kan ^r , Tc ^r | this work |
| plasmids | | |
| pGEM-T | cloning vector, Amp | invitrogen |
| pUC19 | suicide plasmid in <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , Amp ^r | our lab's collection |
| pLAFR6 | broad-host-range cloning vector, Tc ^r | our lab's collection |
| pLGUS | pLAFR6 containing a promoterless <i>gus</i> gene, Tc ^r | [21] |
| pLGUS1553 | pLGUS containing a promoter region of XC1553, <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI, Tc ^r | this work |
| pLGUS1553T-A | pLGUS containing a promoter region of XC1553 with -10 box site mutagenesis from TACGTT to TACGAT, <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI, Tc ^r | this work |
| pLGUS1553T-C | pLGUS containing a promoter region of XC1553 with -10 box site mutagenesis from TACGTT to TACGCT, <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI, Tc ^r | this work |
| pLGUS1553T-G | pLGUS containing a promoter region of XC1553 with -10 box site mutagenesis from TACGTT to TACGGT, <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI, Tc ^r | this work |

1.2 引物和试剂

聚合酶链式反应 (PCR) 所用的 DNA 聚合酶、dNTP 购自公司; 连接酶、限制性内切酶购自上海普

洛麦格生物产品有限公司; 质粒提取试剂盒、纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司。5' RACE 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

表 2. 本研究所用引物

Table 2. Primers used in this study

| primers | primers sequence (5'→3') | purpose |
|-------------------------|---------------------------------------|---|
| pUC19-F | GCCATTCAGGCTGCGCAACTGTT | Verify the insertion clones (288 bp) |
| pUC19-R | TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT | |
| pGEM-T/CT-F | GCGAATTGGGCCCCGACGTCG | Verify the insertion clones (320 bp) |
| pGEM-T/CT-R for RACE | ACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCC | |
| AAP | GGCCACGCGCTGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG | 5' RACE random primer |
| XC1553-GSP1 | CTCAACGCGCTCGCACCA | 5' RACE PCR amplification |
| XC1553-GSP2 | CTGGGCGAGGAGGAGCACTGCT | 5' RACE PCR amplification |
| XC1553-GSP3 | GTGCTTACTGCTGCGTGATTGG | 5' RACE PCR amplification |
| XC1553-CF | CTTAATTTGTGGATATGAGCACC | 5' RACE PCR verification (205 bp) |
| XC1553-CR | TACTGCTGCGTGATTGGGAGCC | |
| for fusion PCR | | |
| SD1553-FF (E) | GGGGAATTCGAGATCCAGGTGCGGGGCCAA | Site mutagenesis for fusion PCR (362 bp) |
| SD1553-FR-G | ATGTTTAATCAACCGTAATCGAAAACAAAATCG | |
| SD1553-FF (E) | GGGGAATTCGAGATCCAGGTGCGGGGCCAA | Site mutagenesis for fusion PCR (362 bp) |
| SD1553-FR-A | ATGTTTAATCAATCGTAATCGAAAACAAAATCG | |
| SD1553-FF (E) | GGGGAATTCGAGATCCAGGTGCGGGGCCAA | Site mutagenesis for fusion PCR (362 bp) |
| SD1553-FR-C | ATGTTTAATCAAGCGTAATCGAAAACAAAATCG | |
| SD1553-RF-A | TTTTCGATTACGATTGATTAACATAAAAACTAG | Site mutagenesis for fusion PCR (260 bp) |
| SD1553-RR (B) | GGGGATCCACTGCTGCGTGATTGGGAGCC | |
| SD1553-RF-G | TTTTCGATTACGTTGATTAACATAAAAACTAG | Site mutagenesis for fusion PCR (260 bp) |
| SD1553-RR (B) | GGGGATCCACTGCTGCGTGATTGGGAGCC | |
| SD1553-RF-C | TTTTCGATTACGTTGATTAACATAAAAACTAG | Site mutagenesis for fusion PCR (260 bp) |
| SD1553-RR (B) | GGGGATCCACTGCTGCGTGATTGGGAGCC | |
| SD1553-FF (E) | GGGGAATTCGAGATCCAGGTGCGGGGCCAA | PCR amplification of the promotor region of XC1553 (597 bp) |
| SD1553-RR (B) | GGGGATCCACTGCTGCGTGATTGGGAGCC | |

1.3 5' RACE

标准的分子与遗传操作方法按照文献 [22] 进行。根据十字花科黑腐病菌 *Xcc* 8004 中基因 XC1553 (NCBI 登陆号为 Gene ID: 3380160) 基因核苷酸序列设计引物。

本研究所用的 RNA 提取试剂盒为 Promega 公司的 SV total RNA Isolation System Kit。将菌株在 XCM2 培养基上培养至 OD_{600} 值为 0.6 - 1.0 后进行 RNA 的提取。操作步骤详见产品说明书。将提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性和浓度后保存于 -80°C 冰箱备用。RNA 经过 DNase 消化之后, 酚抽提纯化。消化后的 RNA 用微量分光光度计 (NanoDrop 1000, ThermoFisher Scientific) 进行定量。

本研究涉及到的 5' RACE 引物详见表 2。具体按照 Invitrogen 公司的 5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends (Cat: 18374-058) 试剂盒说明书上的步骤进行操作。

1.4 T 载体连接和 DNA 测序

将 5' RACE 的最后终产物 AAP/GSP3 扩增后

的纯化产物与 T 载体进行连接, 利用公引和自身引物验证正确后进行测序。本研究的 pGEM-T 载体试剂盒购自 Invitrogen 公司, 连接体系和条件参见产品说明书。DNA 测序公司为北京六合华大基因科技股份有限公司。RACE 测序采用单向测通策略, Fusion PCR 中间体采用双向测通的策略, 以确定点突变的位置无误。

1.5 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 的活性的检测

1.5.1 GUS 融合构建: 根据 *Xcc* 8004 XC1553 基因核苷酸序列, 利用 Fusion PCR 技术对 -10 box 的保守碱基进行碱基置换。选取 -10 box TACGTT 中间 T 置换为 A、C、G, 利用 Vector NTI 软件设计单碱基突变引物 (表 2)。融合 PCR 扩增 XC1553 启动子区片段, 包含 -10 box TACGTT 中的 T 分别突变为 TACGAT-A、TACGCT-C、TACGGT-G 和野生型的 XC1553 基因启动子区的 4 个启动子区 DNA 片段。将纯化后的启动子片段 PCR 产物和克隆载体 pUC19 连接, 挑选阳性克隆送北京六合华大基因股份有限公司测序。将测序验证正确的 XC1553 启动

子区序列经 *EcoRI/BamHI* 双酶切, 克隆至报告质粒 pLGUS (表 1), 电转化 *E. coli* JM109, 提取转化子质粒 DNA, 用 *EcoRI/BamHI* 双酶切验证, 获得重组质粒 pLGUS1553 (野生型), pLGUS1553A (-10 box TA 置换), pLGUS1553C (-10 box TC 置换), pLGUS1553G (-10 box TG 置换)。将重组质粒 pLGUS1553, pLGUS1553A, pLGUS1553C, pLGUS1553G 通过三亲接合导入十字花科黑腐病菌 *Xcc* 8004、 Δ hrpG 和 Δ hrpX 菌株, 在丰富培养基上以 Rif + Tc 筛选三亲接合子。提取三亲接合子质粒 DNA, 用 *EcoRI/BamHI* 双酶切验证阳性克隆。

1.5.2 GUS 活性检测: 将 *Xcc* 菌株在 NYGB 培养基中 28°C 摇床过夜。将新鲜的过夜菌液调整至相同的 OD_{600} 值, 以 10% 的转接量转接至适当的培养基 XCM2 中, 28°C 摇床培养 24 h 后定量测定 GUS 酶活。酶活定义为: 1 mL 菌液在 OD_{600} 值为 1 的条件下, 每分钟水解对硝基苯基- β -D-葡萄糖醛酸苷 (*p*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, PNPG) 产生 1 mg 对硝基苯酚的量为一个酶活单位 1U^[23]。

2 结果和分析

2.1 5' RACE 结果

根据已经发表的 *Xcc* 8004 基因组序列^[24], 用 Vektor NTI 将 5' RACE 产物测序结果与 XC1553 ORF ATG 上游序列一起进行比对, 确定转录起始位点。分析 XC1553 启动子区序列特征, 确定 PIP-box、-35 区、-10 区、-10 box 位置, 结果如图 1 显示。

AGCGGCAACATGGCGTCATTATCCTCGCGGCCTATTCGCGACATACCCCCAG

TTCACTTTGAAAGCCGAATCTTCGCAATTCTGTTTGATGCTCGATTTTGTTTTC
PIP-box -35 region

GATTACGTTTGATTAAACATAAAAAGTAGTTCTTCATCGATG
-10 box +1 translation start codon

图 1. XC1553 启动子区示意图

Figure 1. Schematic diagram of XC1553 promoter, highlighting PIP-box, -35 region, -10 region (-10 box), the transcription start site (+1), and the translation start codon of XC1553.

XC1553 的转录起始位点是 A, 位于起始密码子 ATG 上游的 25 bp 处; -10 box 序列为 TACGTT, 与转录起始位点相隔 5 bp, 与 -10 区位置重叠, 说明

-10 box 即为 -10 区; 间隔 18 bp 处的上游是 -35 区, 序列为 TTGATG; PIP-box 的两个保守序列相隔 15 bp; PIP-box 与 -35 区间隔 8 bp。PIP-box 和 -35 区、-10 box (-10 区) 的整个模体为: TTCAC-N₁₅-TTCGC-N₈-TTGATG-N₁₈-TACGTT。

2.2 GUS 酶活检测

在教科书中经典的 -10 区为 T₈₀A₉₅T₄₅A₆₀A₅₀T₀₆, 其中下标数字为该碱基出现的频率。由于在茄科罗尔斯通式菌 *Ralstonia solanacearum* 中, -10 box (即 -10 区) 模体为 YANNRT, 其中 Y 代表 C/T, R 代表 A/G^[12], 而在水稻白叶枯 *Xoo* 中, -10 box 则为 YANNDT, 其中 Y 代表 C/T, D 代表 A/G/T^[15]。由上面的结果发现 XC1553 的 -10 box 倒数第二个碱基是 T, 说明与茄科罗尔斯通式菌 *Ralstonia solanacearum* 不同, 那么在 *Xanthomonas* 中 -10 box 的 D 位置的碱基是否对于十字花科黑腐病菌来说是转录必须的? 能否被其它碱基所替换? 替换之后的启动子区的转录活性有什么变化? 本研究中, 将利用 Fusion PCR 原理, 在 XC1553 的 -10 box 引入点突变, 将 TACGTT 中的 T 进行点突变, 分别突变为 TACGAT、TACGCT、TACGGT。并且利用融合 GUS 的构建, 研究突变后 XC1553 的启动子区的转录活性有什么变化。

在 *Xcc* 8004 中, -10 box 的倒数第 2 个碱基 T 突变为 A 时, GUS 酶活从 1.074 U 升高到 1.822 U, $P < 0.01$, 为差异极显著; T 突变为 C 时, GUS 酶活为 2.835 U, $P < 0.01$, 为差异极显著; T 突变为 G 时, GUS 酶活为 1.388 U; 突变为 C 时的突变体的酶活最高, 突变为 G 时的酶活增高最少 (图 2)。在 *hrpG* 的突变体 Δ hrpG 中, 未突变启动子区的 Δ hrpG/pLGUS1553 和 3 个突变体 Δ hrpG/pLGUS1553T-A、 Δ hrpG/pLGUS1553T-C、 Δ hrpG/pLGUS1553T-G 的 GUS 酶活均有明显程度的降低 (图 2)。在 *hrpX* 的突变体 Δ hrpX 中, 未突变启动子区的 Δ hrpX/pLGUS1553 和 3 个突变体 Δ hrpX/pLGUS1553T-A、 Δ hrpX/pLGUS1553T-C、 Δ hrpX/pLGUS1553T-G 的 GUS 酶活均亦显著降低, 且突变体的降低幅度较大 (图 2)。结果表明, -10 box 倒数第 2 个碱基的突变会对启动子的活性造成较大影响; 在 XCM2 培养基中, -10 box 突变前后 XC1553 均受 HrpG 和 HrpX 调控, 如图 2 所示。

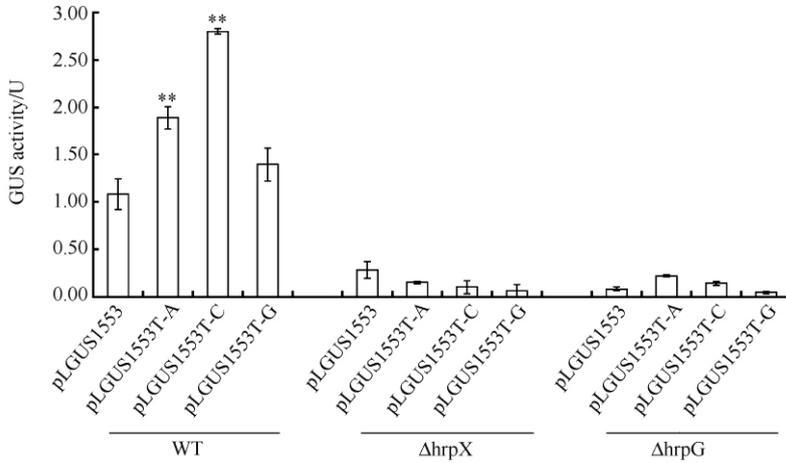


图 2. XC1553 -10 box 点突变菌株在 XCM2 培养基中 GUS 酶活定量检测

Figure 2. Quantification assay for GUS activities of strains harboring -10 box site mutagenesis of XC1553 in XCM2 medium.

3 结论和讨论

在黄单胞菌中, PIP-box 及 -10 box 的模体为 TTCGB-N₁₅-TTCGB-YANNDT, PIP-box 点突变表明,除了保守序列中重要的胞嘧啶外,其余位置单核苷酸替换都是可行的。尤其当置换保守序列最后位置碱基(B)时,如 C 突变为 T, C 突变为 G 后, GUS 活性最高可降低 50%, 而 C 突变为 A 则会抑制启动子的活性^[10]。但 -10 box 的序列保守性如何未见报道。PIP-box 及 -10 box 与经典的启动子 -35 区及 -10 区之间的关系如何,尚不明确。

研究表明 *hrpG* 和 *hrpX* 是 *Xanthomonas* 最关键的调控基因,位于 *hrp* 基因簇的旁侧。HrpG 调控 *hrpX*^[5], HrpX 是一个类 AraC 家族的转录激活子,它调控包括 *hrp* 基因簇调控单元 *hrpA* 到 *hrpF* 在内的大多数 HrpG 调控元基因的表达^[7-8]。-10 box 的碱基突变后对 HrpX 调控的影响还不明确,也有待进一步的研究。

本研究中,首先通过 5' RACE 确定 T3SE AvrAC_{Xcc8004} 其转录起始位点,根据结果分析得到 AvrAC_{Xcc8004} 的启动子区的 PIP-box 和 -35 区、-10 box 的整个模体为:TTCAC-N₁₅-TTCGC-N₈-TTGATG-N₁₈-TACGTT, -10 box 即为 -10 区。接着用 Fusion PCR 对 XC1553 -10 box TACGTT 序列中倒数第 2 个碱基 T 进行点突变为 A/C/G,构建 GUS 融合报告菌株。最后,GUS 定量测定结果表明,将 -10 box 中

的 YANNDT 中 D 突变为不同的碱基,发现碱基置换后的转录活性有所不同。将 -10 box 的倒数第 2 个 T 置换为 A、C 或 G,在 XCM2 诱导培养基上定量测定 GUS 酶活,突变为 C 时的突变体的酶活最高,突变为 G 时的酶活增高最少。结果显示, -10 box 对于 XC1553 启动子活性至关重要。但总体来说,在 XCM2 培养基中,XC1553 -10 box 点突变前后均受 *hrpX* 和 *hrpG* 的调控,表现为在 Δ*hrpX*、Δ*hrpG* 中 GUS 酶活比在 *Xcc* 8004 中低,说明 XC1553 -10 box 点突变并不影响 HrpX 对 XC1553 启动子的调控,暗示 HrpX 可能直接结合于 PIP box TTCGB-N₁₅-TTCGB 的 TTCG 处,而 -10 box,即 -10 区,点突变主要是影响到 RNA 聚合酶的直接结合。

通过研究 HrpX 与 PIP-box 的相互作用,弄清 T3SE 的转录调控机制,这将对阐明病原细菌的致病机制奠定基础,为寻找有效的药物靶标具有重要理论意义。为了使研究结果更具有广泛性和代表性,在接下来的工作中,选取受 *hrpX* 调控的有 PIP-box 的其它 T3SE 基因继续进行 5' RACE 后,确定 -10 box,然后用 Fusion PCR 进行碱基的置换,测定 GUS 酶活,致力于寻找在受 *hrpX* 调控的模式中,有 PIP-box T3SE 的调控机制的异同。

参考文献

- [1] Rudolph K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. Springer, 1993: 193-264.
- [2] Boller T, He SY. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and

- effectors in microbial pathogens. *Science*, 2009, 324 (5928): 742 – 744.
- [3] Tang X, Xiao Y, Zhou JM. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19 (11): 1159 – 1166.
- [4] Bogdanove A, Beer S, Bonas U, Boucher C, Collmer A, Coplin D, Cornelis G, Huang H, Hutcheson S, Panopoulos N. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, 2003, 20 (3): 681 – 683.
- [5] Wengelnik K, Van den Ackerveken G, Bonas U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9 (8): 704 – 712.
- [6] Brito B, Marena M, Barberis P, Boucher C, Genin S. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, 1999, 31 (1): 237 – 251.
- [7] Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (6): 1271 – 1281.
- [8] Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (5): 1340 – 1348.
- [9] Fenselau S, Bonas U. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995, 8 (6): 845 – 854.
- [10] Tsuge S, Terashima S, Furutani A, Ochiai H, Oku T, Tsuno K, Kaku H, Kubo Y. Effects on promoter activity of base substitutions in the cis-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (7): 2308 – 2314.
- [11] Koebnik R, Krüger A, Thieme F, Urban A, Bonas U. Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 (21): 7652 – 7660.
- [12] Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology*, 2004, 53 (1): 115 – 128.
- [13] Lindgren PB. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 1997, 35 (1): 129 – 152.
- [14] Nissan G, Manulis S, Weinthal DM, Sessa G, Barash I. Analysis of promoters recognized by HrpL, an alternative σ -factor protein from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophila*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18 (7): 634 – 643.
- [15] Furutani A, Nakayama T, Ochiai H, Kaku H, Kubo Y, Tsuge S. Identification of novel HrpXo regulons preceded by two cis-acting elements, a plant-inducible promoter box and a -10 box-like sequence, from the genome database of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 259 (1): 133 – 141.
- [16] Kim JG, Li X, Roden JA, Taylor KW, Aakre CD, Su B, Lalonde S, Kirik A, Chen Y, Baranage G, McLane H, Martin GB, Mudgett MB. *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1. *Plant Cell*, 2009, 21 (4): 1305 – 1323.
- [17] Jiang GF, Jiang BL, Chen LG, Wei H, Cen W, Hang X, Wen Z, Tang D, Lu G, He Y. The T3S effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is involved in plant defense through interference with photosystems, reactive oxygen species (ROS) generation, and callose deposition. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (15): 3673 – 3683.
- [18] Xu RQ, Blanvillain S, Feng JX, Jiang BL, Li XZ, Wei HY, Kroj T, Lauber E, Roby D, Chen B, He YQ, Lu GT, Tang DJ, Vasse J, Arlat M, Tang JL. *AvrAC_{Xcc8004}*, a type III effector with a leucine-rich repeat domain from *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* confers avirulence in vascular tissues of *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (1): 343 – 355.
- [19] Miller JH. *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor, 1972.
- [20] Daniels M, Barber C, Turner P, Sawczyk M, Byrde R, Fielding A. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal*, 1984, 3 (13): 3323 – 3328.
- [21] Jiang BL, He YQ, Cen WJ, Wei HY, Jiang GF, Jiang

- W, Hang XH, Feng JX, Lu GT, Tang DJ, Tang JL. The type III secretion effector XopXccN of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is required for full virulence. *Research in Microbiology*, 2008, 159 (3) : 216 – 220.
- [22] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd eds. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [23] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 1987, 6 (13) : 3901 – 3907.
- [24] Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, Wu W, Hao P, Wang L, Jiang BL, Zeng S, Gu WY, Lu G, Rong L, Tian Y, Yao Z, Fu G, Chen B, Fang R, Qiang B, Chen Z, Zhao GP, Tang JL, He C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research*, 2005, 15 (6) : 757 – 767.

Putative promoter region of type III effector gene *avrAC*_{Xcc8004} in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Guofeng Jiang^{1,2}, Qiuju Wu³, Xiaoxia Liang^{2,3}, Lichao Yang³, Liyan Yang³, Lin Wang³, Xiaojian Wu³, Bole Jiang^{2,3*}

¹ College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

² State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

³ College of Life Sciences, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is the cause agent of black rot of crucifers. *Xcc* uses type III secretion system (T3SS) to deliver T3SS effectors (T3SEs) directly into host cells, where they play important roles in pathogenesis. Many identified T3SEs genes contain plant-inducible promoter (PIP) box and –10 box in their promoter regions. However, the relation among PIP-box, –10 box and –10 region, –35 region of the classic promoter is unclear, and the conservative characteristic of –10 box sequence is hardly reported. The aim of this study was to analyze the putative promoter region of T3SE gene *avrAC*_{Xcc8004}. [Methods] Through 5' RACE, the transcriptional start site of *avrAC*_{Xcc8004} was identified. Fusion PCR was introduced to generate the site-mutagenesis of –10 box for constructing the GUS fusion report strains. [Results] The 5' RACE results indicate that the transcription start site was A. After analysis, we found that –35 region was located 8 bp downstream of PIP-box, and –10 box was exactly overlapped with –10 region. The whole motif of PIP-box, –35 region, and –10 box was then counted as: TTCAC–N₁₅–TTCGC–N₈–TTGATG–N₁₈–TACGTT. The GUS assay results demonstrate that the site-mutagenesis of –10 box caused a higher expression of *avrAC*_{Xcc8004}. The GUS activities in the mutant strains Δ hrpX and Δ hrpG were significantly lower than that in the wild type *Xcc* strains. [Conclusion] PIP-box is tandem with –35 region, –10 box is just the same as –10 region, –10 box is important for the transcription of *avrAC*_{Xcc8004}, and HrpG and HrpX activate the expression of *avrAC*_{Xcc8004}, despite of –10 box site-mutagenesis.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, type III effector, HrpX, *avrAC*_{Xcc8004}, PIP-box, –10 box

(本文责编:张晓丽)