

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

管文静, 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】本文的目的为阐明水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo)核苷酸信号途径及其作用机理。【方法】本研究对推导的信号受体蛋白 Clpxoo 进行了基因克隆、序列分析、缺失突变和互补及其相关表型的鉴定。【结果】克隆的 *clpxoo* 基因序列与大肠杆菌 *crp* 和铜绿假单胞菌 *vfr* 的同源性较高, 与其它几种病原黄单胞菌 *clp* 高度保守。Clpxoo 序列 N 端具有环化核苷酸 cNMP 结合结构域(CAP_ED), C 端具有保守的 DNA 结合结构域(HTH_CRP)。用双交换法构建了基因缺失突变体($\Delta clpxoo$)。与野生型菌株 PXO99^A 相比, $\Delta clpxoo$ 的运动性、胞外多糖产生能力和对 H₂O₂ 的抗性均显著降低, 基因互补可使之部分恢复; $\Delta clpxoo$ 胞外酶产生和对烟草致敏性无显著改变。【结论】Clpxoo 可能作为全局性的保守调控因子之一, 调控了 Xoo 的鞭毛运动性、胞外多糖产生和对 H₂O₂ 的抗性。

关键词: Clpxoo, 鞭毛运动性, 毒性, H₂O₂ 抗性, 水稻白叶枯病菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0032-06

环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)是近年来新发现的、广泛存在于细菌中的第二信使, 调控了细菌运动性、生物膜形成、胞外多糖产生、毒性因子表达和解毒作用等诸多方面的功能^[1-3]。在植物病原黄单胞菌中可能存在 c-di-GMP 信号途径, 但至今对于 c-di-GMP 受体或效应子了解甚少^[4]。最近从甘蓝黑腐病菌中发现了 cAMP 信号受体蛋白(大肠杆菌 Crp 和铜绿假单胞菌 Vfr)的同源物 Clpxcc, 推测其可能是 c-di-GMP 核苷酸信号受体或效应子^[5]。

鉴于 c-di-GMP 信号途径在植物病原细菌致病性调控中的重要性, 本实验室采用功能基因组学的方法, 对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo) c-di-GMP 信号途径(包括信号分子的代谢及其调控)的鉴定、对致病性的调控作用及其

机理开展了系统研究(实验室待发表资料)。本文报道对推导的核苷酸信号受体蛋白 Clpxoo(XOO4158)进行基因克隆、序列分析、缺失突变和互补及其表型鉴定的研究结果, 目的在于揭示 Clpxoo 在 Xoo 运动性、生物膜形成、毒性因子产生和 H₂O₂ 解毒作用等方面的调控功能, 为进一步阐明 c-di-GMP 信号传导途径在 Xoo 中作用机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒及培养条件: 供试细菌菌株和质粒的特征及来源列于表 1。Xoo 菌株 PXO99^A 及其突变体在 28℃ PSA 培养基(细菌培养用蛋白胨 10 g/L, 蔗糖 10 g/L, 谷氨酸 1.0 g/L, pH7.0)上培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*) 在 37℃ LB 培养基(细菌培

基金项目: 中央财政国家重点实验室自主研究课题专项(SKL2007SR06)

* 通信作者。Tel: +86-10-62894147; E-mail: cyhe@caas.net.cn

作者简介: 管文静(1983-), 女, 四川人, 硕士研究生, 从事植物-病原物分子互作研究; E-mail: gwj1022@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-07-28; 修回日期: 2008-09-09

养用蛋白胨 10 g/L, 细菌培养用酵母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH7.0) 上培养。试验用抗生素浓度: 氨苄青

霉素 (Amp) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素 (Kan) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和壮观霉素 (Sp) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 本研究所用细菌菌株及质粒

Table 1 The bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	$\Phi 80$ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 thi-1	Our laboratory
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
PX099 ^A	Wild-type strain, Philippine race 6	Our laboratory
Δ clpxoo	Inner deleted clp gene	This study
Δ clpxoo ::C	Sp ^R Δ clp complemented with pHMclp	This study
Plasmid		
pMD18-T	Amp ^R , ColE1 origin, T-vector	TaRaKa Co.
pK18mobsacB	sacB, lacZ α , Km ^r , mcs mobilizable	Our laboratory
pHM1	Sp ^R , Sm ^R , cos, para, IncW, derivative of pRI40	Hopkins et al., 1992
pMDclp	pMD18-T with fragment containing clpxoo	This study
pMDclp-D	pMDclp with deleted parts of clpxoo sequence	This study
pKScIp-D	pK18SacB with deleted parts of clpxoo sequence	This study
pHMclp	pHM1 with fragment containing clpxoo	This study

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa (大连) 公司; 凝胶回收试剂盒纯化试剂盒, DNA 分子量标准购自诺德金生物公司; Carboxymethyl Cellulose, CMC 和 RBB-xylan 购自 Sigma 公司。电击仪 (BIO-RAD 公司 Pluse Controller 仪); 全自动 DNA 测序仪 (ABI Prism 377)。

1.2 基因克隆和序列分析

用 DNAMAN 6 软件对 Xoo 菌株 KACC10331 基因组中 clpxoo 序列 (XOO4158) 进行分析, 设计特异性引物 (clpxoo F/R) (表 2), 以 PX099^A 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行产物检测, 使用凝胶回收纯化试剂盒和 pMD18-T Vector 试剂盒进行基因纯化和连接, 获得质粒 pMDclp。常规 CaCl₂ 法制备热击感受态细胞, 按照文献 [6] 的方法热击转化 *E. coli* 细胞。经酶切, PCR 检测后, 挑取 5 个克隆用 ABI Prism 377 测序仪进行基因序列测定。用 DNASTar 7.1、DNAMAN 6 和 BioEdit 7 进行序列分析; 用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de) 和 CDS 进行蛋白质结构域分析; 用 Blast 进行序列同源性比对。

1.3 基因缺失突变体构建及其互补分析

参照文献 [7] 的方法进行基因标记交换。用于基因标记交换的自杀性质粒载体 pK18mobsacB 不能

在 PX099^A 中复制和扩增, 并且含有蔗糖致死基因 sacB, 带有该质粒的菌株在含有蔗糖的培养基上不能生长。用 Pst I 消化 pMDclp, 切除基因 clpxoo 中间约 280 bp, 进行自连和电泳回收。用 Hind III 和 Xba I 消化中间序列缺失的 pMDclp-D, 连接到经同样酶切处理的 pK18mobsacB, 获得重组质粒 pKScIp-D。用电击法将 pKScIp-D 转化到 PX099A 后, 涂布于 PSA + Kan^R 平板上生长, 长出的菌落在含 10% 蔗糖的 PSA 上划线。对长出的菌落用引物 clpxoo F/R 进行 PCR, 筛选和验证突变体 (Δ clpxoo)。

设计特异性引物 clpxoo 2F/2R (表 2) 扩增 clpxoo 全长基因及前后 300 bp 序列 (推测基因前后 300 bp 序列能够包含全部启动子区域) 克隆到广寄主质粒载体 pHM1 上, 获得重组质粒 pHMclp。用电击法转化到 Δ clpxoo 中, 涂布在 PSA + Sp 平板上生长, 将长出的菌落重新转接在 PSA + Sp 平板, 重复转接 3 次以上, 得到互补子。对互补菌株 Δ clpxoo ::C 进行提取质粒及其酶切验证。

表 2 本研究所用引物列表

Table 2 The sequences of primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
clpxoo F	CCTCTAGACGCACCATCGAGCGTTTC
clpxoo R	CCAAGCTTAGGCAGTCGTTCCAGTGGG
clpxoo 2F	CCGGTACCTCGGATATTGAGGATGTTCG
clpxoo 2R	CCGTCGACCGGTAAGCGCTGTAGGT

1.4 细菌运动性、胞外酶和多糖产生、 H_2O_2 抗性和对烟草致敏性的测定

将细菌培养至平台期,静置约 40 min,观察细菌沉降能力。参照文献 [8] 的方法,在含有 0.3% 琼脂糖的半固体培养基上进行细菌运动性的测定。参照文献 [9] 的方法,检测浓度为 500 mmol/L H_2O_2 所形成抑菌圈,进行细菌对 H_2O_2 敏感性测定。参照文献 [10] 的方法,用结晶紫染色法检测细菌形成生物膜的能力。参照文献 [5],用乙醇沉淀 100 mL 菌液,进行胞外多糖产生能力测定。参照文献 [11,12] 的方法,检测培养基上菌落周围产生的底物水解圈,进行纤维素酶和木聚糖酶活性的测定。参照文献 [13] 的方法,将菌悬液($OD_{600} = 0.5$)注射接种到普通烟叶片,接种后 2 d 观察叶片 HR 的产生。

2 结果和分析

2.1 Clpxoo 的基因克隆、功能结构域和序列同源性

以 Xoo 菌株 PXO99^A 基因组 DNA 为模板,用特异性引物进行 PCR 扩增,成功地获得了 920 bp 的 *clpxoo* 基因片段及其旁侧序列。将这些克隆片段进行测序,其序列与 GenBank 中 PXO99^A 菌株基因序列完全一致。

生物信息学分析表明,*Clpxoo* 是 CAP 蛋白家族成员之一,由 230 个氨基酸组成,分子量为 25.65 kDa,N 端 18-137 氨基酸具有环化核苷酸 cNMP 结合结构域(CAP_ED),C 端 180-228 氨基酸具有 DNA 结合保守结构域(HTH_CRP),通过结合靶基因启动子区域、激活基因的转录(图 1)。

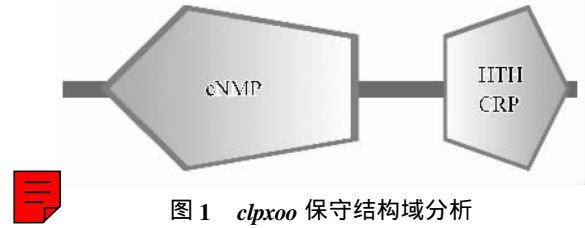
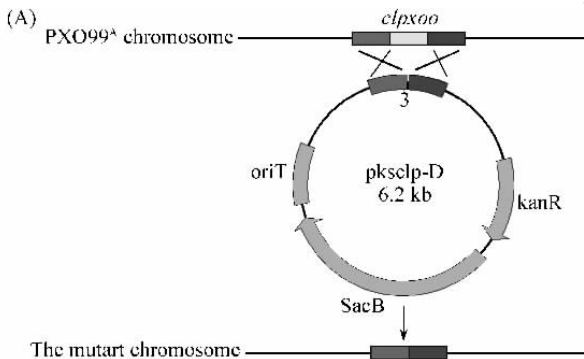


图 1 *clpxoo* 保守结构域分析

Fig. 1 Domain architecture of *clpxoo*.

clpxoo 与其它 10 种重要动植物病原细菌同源序列进行比对表明,*clpxoo* 基因序列与大肠杆菌 *crp* 和铜绿假单胞菌 *yfr* 具有较高的同源性,氨基酸同源性分别为 42.79% 和 46.22%;*clpxoo* 与其它几种黄单胞菌 *clp* 相比较,氨基酸同源性均为 90% 以上,说明 *clp* 在黄单胞杆菌中高度保守。系统发育聚类分析表明,11 种重要动植物病原菌可分为 3 类,第一类为葡糖醋酸杆菌,第二类为黄单胞杆菌、大肠杆菌和铜绿假单胞杆菌,第三类为金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌和变形链球菌(图 2)。

2.2 $\Delta clpxoo$ 突变体构建和互补

根据 *clpxoo* 上下游相邻核苷酸序列,设计引物 *clpxoo*F/R 扩增 920 bp 片段,构建用于基因突变的重组质粒 pKScIp-D。将 pKScIp-D 导入 PXO99^A 后,缺失片段两端的 *clpxoo* 片段与 PXO99^A 基因组相应的片段发生同源重组和双交换事件,从而获得了基因缺失突变体($\Delta clpxoo$) (图 3-A)。对 PXO99^A 和 $\Delta clpxoo$ 进行 *clpxoo* 片段的 PCR 检测,发现引物 *clpxoo*F/R 从 $\Delta clpxoo$ 中的扩增条带比 PXO99^A 中的小 280 bp(图 3-B),表明 $\Delta clpxoo$ 基因组中已缺失了 *clpxoo*。

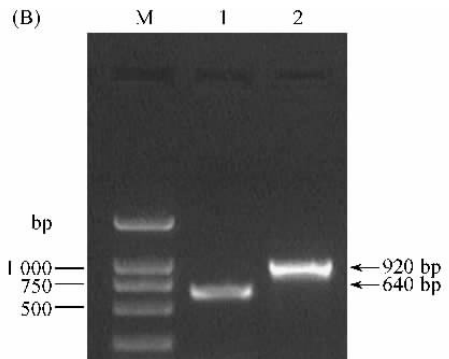


图 3 $\Delta clpxoo$ 突变体构建

Fig. 3 Construction of $\Delta clpxoo$ mutant of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A. A Schematic used in gene deletion mutant construction. B PCR amplification of *clpxoo* in PXO99A and $\Delta clpxoo$. M. DL2000 Marker; 1, $\Delta clpxoo$; 2, PXO99^A.

将构建好的互补载体 pHMclp 电击转化到相应的突变体中,在 PSA + Sp 平板上连续培养,挑选互补子(Sp^R)。对互补子进行质粒提取和酶切分析验证(未列出资料),获得了互补菌株 $\Delta clpxoo$:C。

2.3 $\Delta clpxoo$ 突变体的表型

分别对 PXO99A、 $\Delta clpxoo$ 及其互补菌株 $\Delta clpxoo$:C 进行细菌鞭毛运动性、沉降能力、生物膜形成、 H_2O_2 敏感性、胞外降解酶活性、胞外多糖产

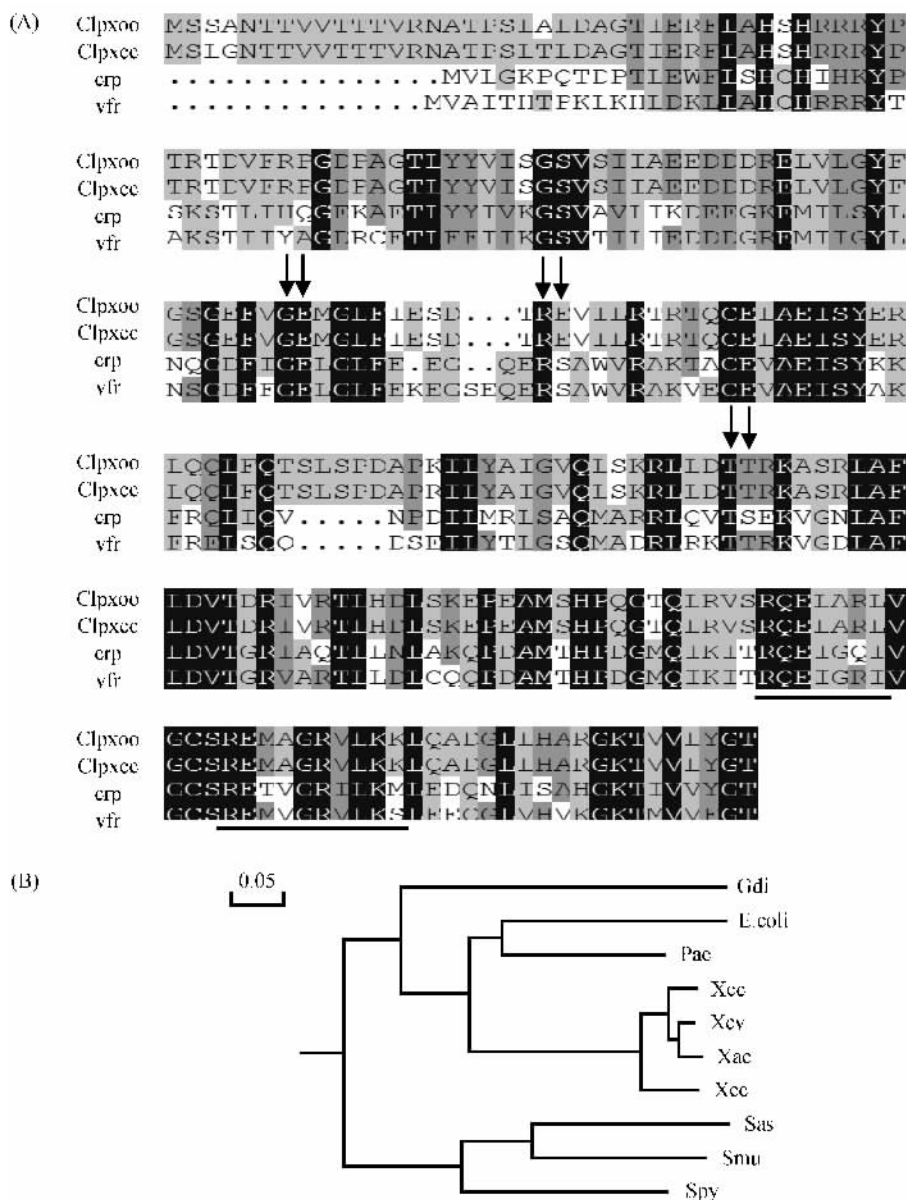
图2 氨基酸同源性分析及 *clp* 系统发育聚类分析

Fig.2 Sequence similarity and phylogenesis of Clp and homologues. A Peptide sequence alignment of Clpxoo of *X. oryzae* pv. *oryzae* PX099^A, Clpxcc of *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913, Crp of *E. coli* and Vfr of *P. aeruginosa*. The cNMP- and DNA-binding domains predicted were indicated. The amino acid residues G71, E72, R82, S83, T127 and S128 of Crp implicated in cAMP binding were indicated in arrows. The conserved helix-turn-helix motif in DNA-binding domain was underlined. Genbank accession number: clpxoo AAW77412; clpxcc CAP49836; crp AAC76382; vfr AAG04041. B: Xoo, *X. oryzae* pv. *oryzae* PX099^A; Xcc, *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913; Xac, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 306; Xcv, *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10; Gdi, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5; Sas, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_TCH1516; Snu, *Streptococcus mutans* UA159; Spy, *Streptococcus pyogenes* MGAS8232; *E. coli*, *Escherichia coli* K12 substr. MG1655; Pae, *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14

生、和致敏性测定(图4,5)。与野生型菌株 PX099^A 相比, Δ clpxoo 在菌体沉降、半固体培养基上的泳动、胞外多糖产生和 H₂O₂ 抗性方面发生了显著的改变,基因互补可以部分恢复 Δ clpxoo 的表型。此外,与 PX099^A 相比, Δ clpxoo 在生物膜形成、胞外纤维素酶和木聚糖酶活性、引起非寄主植物烟草 HR 的能力方面无明显改变。

3 讨论

近年来,病原细菌环化核苷酸信号途径及其作用机理的研究受到愈来愈多的关注。对大肠杆菌和铜绿假单胞菌的相关研究发现,环化寡核苷酸信号受体蛋白 Crp 和 Vfr 通过结合 cAMP,调控着细菌许多方面的生物学功能。然而,虽然已报道在黄单胞菌中发现了 Crp 和 Vfr 的同源物,但在基因组中至今

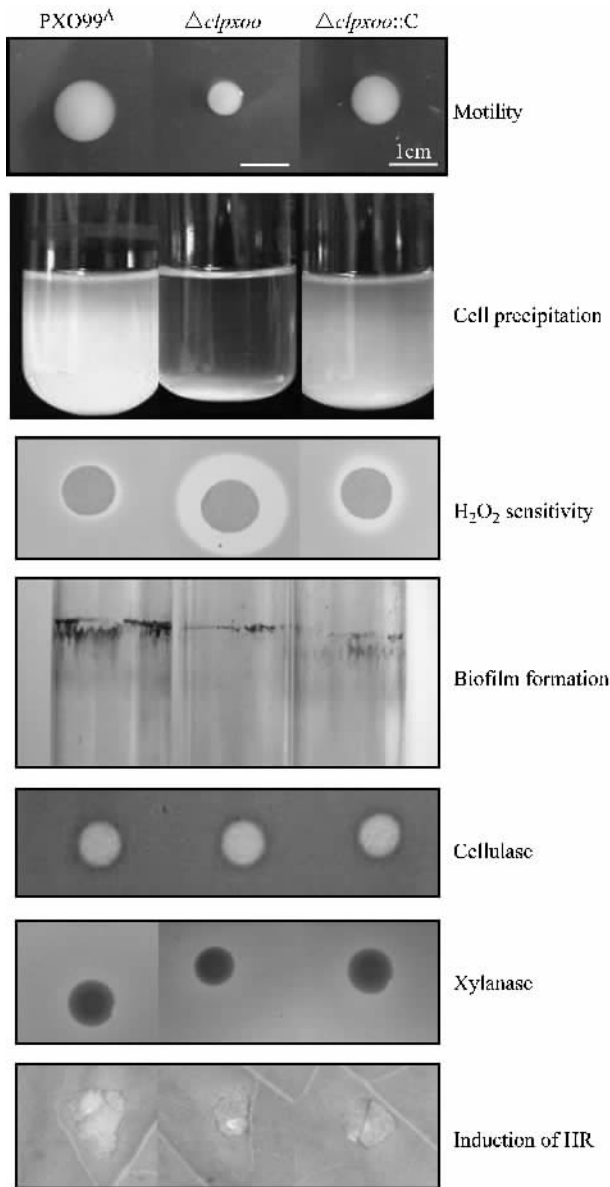


图4 $\Delta clpxoo$ 突变体运动性、菌体沉降、 H_2O_2 敏感性、生物膜形成、诱导烟草叶片过敏反应测定

Fig.1 Bacterial motility ,cell precipitation , H_2O_2 sensitivity ,biofilm formation , extracellular enzyme production , and induction of hypersensitive response on tobacco leaves of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains.

未发现负责合成 cAMP 的 *cya* 同源物 ,也未检测到 cAMP 信号物质的存在^[14]。表明 Clp 可能通过结合其它寡核苷酸发挥作用。由于黄单胞菌存在 c-di-GMP 信号途径 ,推测 Clp 可能作为潜在的信号分子受体 ,调控下游基因表达及其表型。

本研究首先对 Clpxoo 进行分子克隆及其功能鉴定 ,报道了 Clpxoo 是 Crp 和 Vfr 的同源物 ,N 端具有环化核苷酸 cNMP 结合结构域 ,推测其可能是 c-di-GMP 的受体 ;明确了它对细菌运动性、毒性因子产生、生物膜形成以及 H_2O_2 解毒的调控作用。Clpxoo 基因发生缺失突变明显地影响了病菌的运动能力、

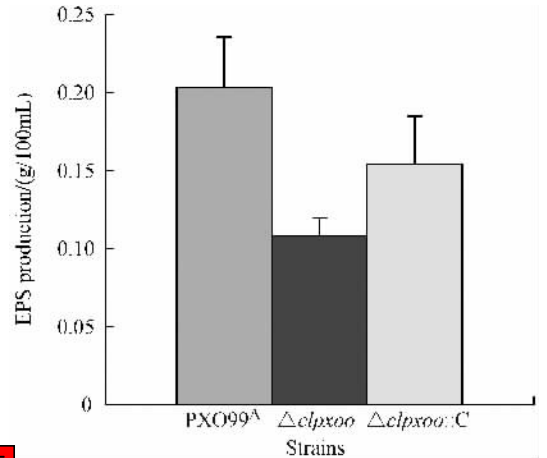


图5 $\Delta clpxoo$ 突变体外多糖产生测定

Fig.5 Extracellular polysaccharide production of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains.

胞外多糖产生和 H_2O_2 抗性 ,基因互补可使之恢复。这些因为 *clpxoo* 突变所引起的表型变化与 c-di-GMP 调控的细胞功能很类似(作者另文发表) ,表明 Clpxoo 可能位于 c-di-GMP 信号途径的下游 ,调控病菌的生物学功能。目前 ,正在深入地分析 c-di-GMP 代谢相关基因对下游的 *clpxoo* 表达的影响、c-di-GMP 与 Clpxoo 的直接结合作用 ,以阐明二者之间的关系。

Clpxoo 除 N 端具有 cNMP 结合结构域 ,C 端具有 DNA 结合结构域 ,具备转录激活子典型的结构特征。Clpxoo 不仅在植物病原黄单胞菌中具有高度保守的序列同源性 ,而且在其它动物和医学病原细菌中也具有一定的序列同源性 ,表明其在动植物病原细菌中的结构保守性。有必要深入研究 Clpxoo 是否具有功能上的保守性。一旦得以阐明 ,它可能会成为一个新型抗菌药物的分子靶标。

参考文献

- [1] Rita T ,Pratt JT ,Camillii A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Review Microbiology* 2007 61 :131 - 148.
- [2] Urs Jenal , Malone J. Mechanisms of Cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review Genetics* 2006 40 384 - 407
- [3] Wolfe AJ ,Visick KL. Get the message out :cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *Journal of Bacteriol* 2008 14 463 - 475.
- [4] Ryan RP ,Fouhy Y ,Lucey JF , et al. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* ,2007 ,63 (2) :429 - 442.

- [5] He YW ,Ng AYJ ,Min X ,et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Molecular Microbiology* 2007 64(2) 282 – 292.
- [6] Sambrook J ,Fritsch EF ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [7] Lee SW ,Ronald PC. *Plant-Pathogen Interaction*. Totowa , NJ :Humana Press 2007.
- [8] Shen YW ,Chern MS ,Silva FG ,et al. Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2001 ,14(2) 204 – 213.
- [9] Mongkolsuk S ,Whangsuk W ,Vattanaviboon P ,et al. A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *Journal of Bacteriology* , 2000 ,11 6845 – 6849.
- [10] Kulasakara H Lee V Bencic A et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2006 ,103 2839 – 2844.
- [11] Andro T ,Chambost JP ,Kotoujansky A ,et al. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *Journal of Bacteriology* 1984 160(3) 1199 – 1203.
- [12] Keen NT ,Boyd C ,Henrissat B. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1996 9(7) 651 – 657.
- [13] Tsuchiya K ,Mew TW ,Wakimoto S. Bacteriological and pathological characteristics of wild types and induced mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathology* 1982 72(1) 43 – 46.
- [14] Crecy-Lagard V ,Glaser P ,Lejeune P ,et al. A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *Journal of Bacteriol* 172(1990) 5877 – 5883.

Molecular identification and functional analysis of Clpxoo , a homologue to the nucleotide receptor protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Wenjing Guan ,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 , China)

Abstract [Objective] To better understand the mechanisms of cyclic di-GMP signaling in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) , the casual pathogen of bacterial blight of rice , molecular identification of Clpxoo. **[Methods]** A putative signal receptor protein was performed through gene cloning , sequencing and deletion analysis. **[Results]** Sequence analysis showed Clpxoo was a homologue of Crp and Vfr , the cAMP receptor proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* respectively , which had the cNMP-binding domains (CAP_ED) at N terminal and the DNA-binding domains (HTH_CRP) at C terminal and is highly conserved in the plant-pathogenic *Xanthomonas* spp. We constructed Δ *clpxoo* through a double crossover recombination and validated by PCR assay , Δ *clpxoo* displayed the reduced motility and extracellular polysaccharide (EPS) production , and increased sensitive to H₂O₂ toxicity compared with PXO99^A. All these phenotype changes could be partly restored through complementation of mutants by introducing *clpxoo*. Moreover , we observed no significant changes in production of extracellular cellulase and xylanase *in vitro* , biofilm formation and induction of hypersensitive response (HR) on non-host tobacco in Δ *clpxoo* compared to PXO99^A. **[Conclusion]** Therefore , Clpxoo played a role as one of the global regulator in regulation of flagellar motility , EPS production and H₂O₂ resistance.

Keywords : Clpxoo ; flagellar motility ; virulence ; H₂O₂ resistance ; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

(本文责编 张晓丽)