

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 博士学位论文

水稻白叶枯病菌 Tdrxoo/GacAxoo 调控系统的鉴定及其  
对运动性和毒性调控功能的分析

Identification and Functional Analysis of a Regulatory Pathway  
Leading from Tdrxoo/GacAxoo to Motility and Virulence in  
*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

博士研究生：许景升

指导教师：何晨阳 研究员

申请学位类别：农学博士

专 业：植物病理学

研 究 方 向：植物—病原物分子互作

培 养 单 位：中国农业科学院研究生院  
植物保护研究所

提交日期 2007 年 6 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences**  
**Ph.D Dissertation**

**Identification and Functional Analysis of a Regulatory  
Pathway Leading from Tdrxoo/GacAxoo to Motility and  
Virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae***

Ph.D Candidate: XU Jingsheng

Advisor: Professor HE Chenyang

Major: Plant Pathology

Specialty: Molecular Plant-Microbe Interactions

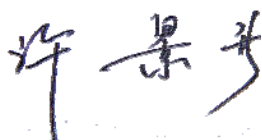
Chinese Academy of Agricultural Sciences

**June 2007**

## 独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：




时间：2007 年 06 月 20 日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

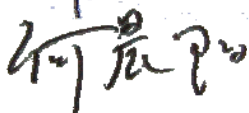
(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：



时间：2007 年 06 月 20 日

导师签名：



时间：2007 年 06 月 21 日

# 论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	水稻白叶枯病菌 Tdrxoo/GacAxoo 调控系统的鉴定及其对运动性和毒性调控功能的分析				
论文作者	许景升	指导教师	何晨阳	培养单位	植物保护研究所

评阅人	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
	徐世昌	研究员	博导	植物保护研究所	植物病理学
	国立耘	教授	博导	中国农业大学	植物病理学
	范在丰	教授	博导	中国农业大学	植物病理学
答辩主席	于嘉林	教授	博导	中国农业大学	植物病理学
答辩委员	王慧敏	教授	博导	中国农业大学	植物病理学
	李怀方	教授	博导	中国农业大学	植物病理学
	刘玉乐	教授	博导	清华大学	生物化学与分子生物学
	陈万权	研究员	硕导	植物保护研究所	植物病理学
	冯 洁	研究员	博导	植物保护研究所	植物病理学
	段霞瑜	研究员	博导	植物保护研究所	植物病理学
答辩时间与地址		中国农业科学院植物保护研究所六楼会议室 2007 年 06 月 19 日 10:30-12:20			
记录人员		吴茂森 副研究员			

# 摘要

水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 简称 Xoo)引起的白叶枯病是世界水稻生产上最严重的细菌病害之一,也是植物-病原物互作研究的重要模式系统之一。近十年来,对 Xoo 致病相关基因的研究,大大增加了人们对其致病机理以及水稻互作分子基础的认识。虽然已经从 Xoo 中鉴定出了几十个致病相关基因,但由于 Xoo 与水稻之间的互作关系以及致病机理比较复杂,许多毒性和无毒机制至今仍不清楚,致病相关基因的表达和调控网络及其机理尚待阐明。对 Xoo 致病调控机理的解析,将为发展新型、有效和可持续的病害控制策略和方法提供科学依据。最近公布的 Xoo 全基因组序列,为全面和系统地开展 Xoo 基因组学研究提供了前所未有的机遇。

为了发掘 Xoo 毒性/运动性及其基因表达的调控网络和途径,本研究以在植物病原细菌普遍存在的双组分调控系统(TCS) GacS/GacA 为靶标,根据丁香假单胞菌致病变种应答调节因子 GacApst 基因序列,搜索 Xoo 全基因组序列,鉴别了该基因的同源序列 *gacAxoo*。设计引物 *gacAF/gacAR*,从 Xoo 基因组中克隆出 *gacAxoo*。序列分析表明,*gacAxoo* 全长 648 bp,编码 215 个氨基酸,分子量为 23.2 kD, pI 为 6.76。*gacAxoo* 在黄单胞菌中是保守的。*GacAxoo* 与其他 GacA 一样,具有 LuxR 保守结构域。采用标记置换方法,构建了  $\Delta$  *gacAxoo* 突变体。 $\Delta$  *gacAxoo* 对水稻的致病性、对非寄主植物烟草的致敏性和胞外酶类产生与野生型菌株相比无明显差异,但是其运动能力明显减弱。因此,*gacAxoo* 基因可能参与了 Xoo 运动性的调控。

通过酵母双杂交(Y2H)技术,以 *GacAxoo* 为诱饵蛋白,从 Xoo cDNA 文库中筛选出与 *gacAxoo* 发生互作的基因,其中一个与 *GacAxoo* 互作的蛋白 Tdrxoo 具有 TonB-Dependent-Receptor (Tdr)结构域。序列分析表明,Tdrxoo 由 969 个氨基酸组成,1-23 个为信号肽,55-167 个为 plug 结构域,608-969 个为 TonB-Dep-Rec 结构域。Tdrxoo 与细菌外膜蛋白同源,具有接收胞外信号功能的胞外环和跨膜功能的反向  $\beta$ -折叠桶结构。采用插入突变的方法,对 *tdrxoo* 基因进行功能分析。与野生型菌株相比, $\Delta$  *tdrxoo* 致病性丧失,不产生胞外酶和胞外多糖,运动能力减弱,生长受到严重抑制,但是仍能引起烟草的 HR,生物被膜形成能力增强。因此,推测 Tdrxoo 可能位于 Xoo 细胞外膜,负责接受来自植物或环境信号的未知信号;*tdrxoo* 的突变可能影响了体外信号的识别或营养成分(如蔗糖)的转运。

*tdr*基因在黄单胞菌中具有结构保守性。在柑桔溃疡病菌(Xac306)、甘蓝黑腐病菌(Xcc8004 和 ATCC33913)、辣椒斑点病菌(Xcv85-10)、水稻白叶枯病菌(XooKACC10331)和水稻白叶枯病菌(XooMAFF311018)基因组中分别存在 68、65、64、52、36 和 36 个 *tdr*基因。在所分析的 226 种 G<sup>-</sup>细菌中,*tdr*基因分布存在差异,27%的细菌不具有 *tdr*基因,但是 15.5%的细菌具有 30 个以上的 *tdr*基因,这些细菌绝大部分属于  $\alpha$  或  $\gamma$ -变形菌纲或者拟杆菌属。因此,推测 Tdr 在这些细菌中可能具有功能保守性。

总之,在 Xoo 中存在 Tdrxoo/GacAxoo 调控途径,推测 Tdrxoo 是细胞外膜蛋白,可以识别胞外环境中的信号,并将信号传递至胞内。Tdrxoo 参与调控了 Xoo 多种生物学表型的表达,包括致病性、运动性、胞外多糖产生、胞外酶活性、生物被膜形成和细菌生长。此外,位于 Tdrxoo 下游的 *GacAxoo* 参与了 Xoo 运动性的调控。

**关键词:** 水稻白叶枯病菌; *GacAxoo*/Tdrxoo; 毒性; 运动性; 调控途径

## Abstract

*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), the casual agent of bacterial blight of rice, is one of the most important pathogens of rice in the world, and a bacterial pathogen model to study the plant-pathogen interactions. In the last decade, the understanding of molecular basis of interactions of Xoo with rice has been advanced by the characterization of pathogenicity-related genes and regulatory pathways from the bacteria. However, there is still little knowledge about the pathogenesis process since the interactions between rice and Xoo are complicated. This project is aiming to identify novel genes and factors involved in this process. The goal is to help develop more innovative, effective and durable strategies for the disease control. The availability of whole genome sequencing of Xoo has provided the new opportunities and prospective for the study on Xoo biology on a genome-wide scale.

A *gacA* homologue (*gacA<sub>xoo</sub>*) was cloned from the genomic DNA of Xoo (PXO99<sup>A</sup>) with the degenerated primers *gacAF/gacAR* by polymerase amplification reaction (PCR) according to the *gacApst* sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Sequence analysis showed that the *gacA<sub>xoo</sub>* gene (648bp) putatively encoded a protein with 215 amino acids in length. The molecular weight of GacA<sub>xoo</sub> is 23.2 kD with a pI of 6.76. The *gacA* gene was found to be conserved in the *Xanthomonas* genus. Blast search indicated that GacA<sub>xoo</sub> had a similar structure to that of other GacA proteins, and had conserved domain of LuxR-like proteins. A deletion mutant ( $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>*) was obtained after a double cross-over recombination event between the Gentamycin gene and *gacA<sub>xoo</sub>* through the marker exchange.  $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>* was validated by PCR analysis of *gacA* and *Gm* gene detection. The mutant was further characterized by no significant changes in pathogenicity on rice, induction of hypersensitive response (HR) on tobacco and extracellular enzyme production compared to PXO99<sup>A</sup>. However, the motility of  $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>* was reduced on the semi-solid medium compared to PXO99<sup>A</sup>. Therefore, GacA<sub>xoo</sub> is involved in the regulation of bacterial motility of Xoo.

The cDNA library of Xoo was screened by the yeast two-hybrid (Y2H) system using GacA<sub>xoo</sub> as the bait protein to identify its interacting proteins. An interacting protein (Tdrxoo) is homological to a protein with the TonB-Dependent-Receptor (TDR) domain. The sequence analysis shows that *tdrxoo* contains 2,910 bp nucleotides encoding Tdrxoo with 969 amino acids, which contains a signal peptide from 1 to 23 amino acids, a plug domain from 55 to 167 amino acids and a TonB-Dep-Rec domain from 608 to 969 amino acids. An extracellular loop to recognize the extracellular signal and a  $\beta$ -sheet for trans-membrane domains exist in Tdrxoo. Thus, Tdrxoo is proposed to be localized in the out membrane, receiving the unidentified extracellular signals.

$\Delta$ *tdrxoo*, the disrupted mutant was obtained after a single cross-over recombination event between *tdrxoo* and the plasmid pKtdr with the *tdrxoo* segment.  $\Delta$ *tdrxoo* lost the abilities of causing the disease, and producing the extracellular enzymes and EPS compared to PXO99<sup>A</sup>. In addition, the bacterial motility and growth *in vitro* of  $\Delta$ *tdrxoo* was reduced. This is probably due to the mutant unable to receive signals from plants or environments, therefore, affecting nutrients transportation (i.e. sucrose) or signal transduction.

The *tdr* gene is considerably conserved in *Xanthomonas* spp. There are 68, 65, 64, 52, 36 and 36 *tdr* genes found in *X. axonopodis* pv *citri* 306, *X. campestris* pv *campestris* 8004, *X. campestris* pv *campestris* ATCC 33913, *X. campestris* pv *vesicatoria* 85-10, *X. oryzae* pv *oryzae* KACC10331 and *X. oryzae* pv *oryzae* MAFF 311018, respectively. The distribution of *tdr* in 226 species of Gram-negative bacteria varies, for example, 27% bacteria have not *tdr* genes, while 15.5% bacteria from  $\alpha$ - or  $\gamma$ -Proteobacteria or Bacteroides have over 30 *tdr*. As a result, Tdrxoo might specially function in these bacteria.

In summary, a novel Tdrxoo/GacAxoo-containing regulatory system was identified from Xoo in this study. Tdrxoo is probably localized in the outer membrane of bacterial cells, recognizing the signals from extracellular environment, and inducing the intracellular signal transduction. According to the existence of *tdrxoo* in Xoo genome and phenotype of  $\Delta$ *tdrxoo*, Tdrxoo is proposed to be involved in the sugar metabolism or transportation. Gacxoo is the downstream component of the Tdrxoo/GacAxoo regulatory pathway, and involved in the regulation of bacterial motility.

**Key words:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; Tdrxoo/GacAxoo; motility; virulence; regulatory pathway

# 目 录

第一章 绪论 .....	1
1.1 植物—病原细菌的相互作用 .....	1
1.1.1 致病因子 .....	1
1.1.2 植物病原细菌的早期侵染事件 .....	5
1.1.3 植物病原细菌致病因子的调控机制 .....	6
1.2 致病相关基因的突变方法 .....	8
1.2.1 诱变 .....	8
1.2.2 标记置换 (Marker Exchange) .....	9
1.2.3 基因的转移 .....	10
1.3 酵母双杂交系统的发展及应用 .....	10
1.4 水稻白叶枯病菌致病性的分子机理 .....	12
1.4.1 Xoo基因组的总体特征 .....	13
1.4.2 Xoo与Xac和Xcc的全基因组序列比较 .....	14
1.4.3 活动组分 .....	14
1.4.4 代谢特征和RM系统 .....	15
1.4.5 致病相关基因 .....	15
1.5 GacS/GacA双组分调控系统及其调控机理 .....	22
1.5.1 GacS/GacA双组分调控系统的定义 .....	23
1.5.2 GacS/GacA双组分调控系统的结构特征 .....	23
1.5.3 GacS/GacA同源物中的保守结构域 .....	24
1.5.4 GacS/GacA双组分调控系统模型及其相关联因子的研究 .....	25
1.5.5 GacS/GacA双组分调控系统在植物—病原物互作中的调控研究 .....	25
1.6 本研究的目的意义和技术路线 .....	27
1.6.1 研究目的和意义 .....	27
1.6.2 技术路线 .....	27
第二章 水稻白叶枯病菌 <i>gacAxoo</i> 基因的功能分析 .....	28
2.1 实验材料 .....	29
2.1.1 菌株和质粒 .....	29
2.1.2 生化试剂 .....	29
2.1.3 培养基和菌株培养条件 .....	29
2.2 实验方法 .....	30
2.2.1 Xoo基因组DNA的制备 .....	30
2.2.2 <i>gacAxoo</i> 基因的扩增 .....	31
2.2.3 <i>gacAxoo</i> 基因纯化 .....	32
2.2.4 <i>gacAxoo</i> 基因的连接与转化 .....	32
2.2.5 质粒DNA的提取 .....	34



2.2.6 标记置换法构建 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体.....	34
2.2.7 构建 $gacA_{xoo}$ 突变体的互补菌株.....	35
2.2.8 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体致病性测试和过敏性反应(HR)分析.....	35
2.2.9 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体运动性(motility)检测 .....	36
2.2.10 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体胞外酶活性的检测.....	36
2.2.11 $gacA_{xoo}$ 序列的生物信息学分析.....	36
2.3 结果与分析.....	37
2.3.1 $gacA_{xoo}$ 基因克隆.....	37
2.3.2 $gacA_{xoo}$ 生物信息学分析.....	37
2.3.3 构建 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体菌株.....	41
2.3.4 $\Delta gacA_{xoo}$ 基因突变体的互补分析.....	42
2.3.5 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体HR诱导能力和致病性测试 .....	43
2.3.6 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体运动性分析.....	44
2.3.7 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体胞外酶活性分析.....	45
2.4 讨论.....	45
第三章 酵母双杂交系统分析与GacA <sub>xoo</sub> 互作的相关蛋白 .....	48
3.1 实验材料.....	49
3.1.1 菌株和质粒.....	49
3.1.2 生化试剂.....	50
3.1.3 培养基和培养条件.....	50
3.1.4 酵母菌株的活化.....	50
3.2 实验方法.....	51
3.2.1 制备双酶切诱饵载体pGBKT7.....	51
3.2.2 制备 $gacA_{xoo}$ 诱饵质粒.....	51
3.2.3 Xoo总RNA提取 .....	52
3.2.4 RNA样品中残余DNA去除.....	52
3.2.5 cDNA文库的构建 .....	53
3.2.6 酵母菌株感受态细胞的制备.....	54
3.2.7 诱饵载体和捕获文库共转化酵母.....	55
3.2.8 超声波法提取质粒DNA .....	55
3.2.9 质粒DNA的扩增.....	56
3.2.10 互作蛋白的再次验证.....	56
3.2.11 阳性克隆质粒DNA序列分析 .....	57
3.3 结果与分析.....	57
3.3.1 $gacA_{xoo}$ 诱饵载体的制备.....	57
3.3.2 提取和纯化Xoo总RNA .....	58
3.3.3 合成和纯化双链cDNA .....	58
3.3.4 诱饵载体pGBKT7- $gacA_{xoo}$ 和Xoo捕获文库的互作分析.....	58

3.3.5 GacA <sub>xoo</sub> 与Tdrxoo互作的再验证.....	60
3.4 讨论.....	60
第四章 水稻白叶枯病菌 <i>tdrxoo</i> 基因的功能分析.....	63
4.1 实验材料.....	63
4.1.1 菌株和质粒.....	63
4.1.2 生化试剂.....	64
4.1.3 培养基和菌株培养条件.....	64
4.2 实验方法.....	64
4.2.1 $\Delta tdrxoo$ 突变体质粒制备.....	64
4.2.2 $\Delta tdrxoo$ 基因突变体构建.....	64
4.2.3 $\Delta tdrxoo$ 突变体的互补菌株构建.....	65
4.2.4 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 双基因突变菌株构建.....	65
4.2.5 致病性和HR反应测定.....	65
4.2.6 运动性测定.....	65
4.2.7 胞外多糖分泌检测.....	65
4.2.8 胞外酶类活性测定.....	65
4.2.9 生长曲线测定.....	66
4.2.10 嗜铁素(siderophore)产生的检测.....	66
4.2.11 $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 鞭毛电镜观察.....	66
4.2.12 生物被膜(Biofilm)的定性检测.....	66
4.2.13 <i>tdrxoo</i> 基因的生物信息学分析.....	66
4.2.14 革兰氏阴性细菌中TDR类基因分析.....	66
4.3 结果与分析.....	67
4.3.1 $\Delta tdrxoo$ 的制备.....	67
4.3.2 $\Delta tdrxoo$ 互补菌株的制备.....	68
4.3.3 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 双基因突变菌株的构建.....	68
4.3.4 突变体致病性和HR反应分析.....	69
4.3.5 胞外多糖分泌检测.....	70
4.3.6 突变体菌株运动性分析和鞭毛的电镜观察.....	70
4.3.7 突变体菌株胞外酶分析.....	71
4.3.8 嗜铁素产生的检测.....	71
4.3.9 生长曲线的测定.....	71
4.3.10 Biofilm形成分析.....	72
4.3.11 <i>tdrxoo</i> 基因的生物信息学分析.....	72
4.3.12 <i>tdr</i> 基因分析.....	76
4.4 讨论.....	77
第五章 全文结论.....	81
参考文献.....	83

附录.....	102
致 谢.....	103
作 者 简 历.....	104

# 图 目 录

图 1-1 GacS/GacA双组分调控系统的信号转导途径 .....	24
图 2-1 <i>gacA</i> oo PCR扩增.....	37
图 2-2 <i>Gm</i> 基因PCR扩增.....	37
图 2-3 <i>gacA</i> oo序列图 .....	38
图 2-4 GacAoo保守结构域分析.....	38
图 2-5 <i>gacA</i> 核苷酸序列同源性分析 .....	39
图 2-6 黄单胞菌属 <i>gacA</i> 核苷酸序列同源性比对 .....	40
图 2-7 黄单胞菌属GacA氨基酸序列同源性分析 .....	40
图 2-8 GacA氨基酸序列同源性分析 .....	40
图 2-9 <i>gacA</i> 系统发育聚类分析 .....	41
图 2-10 标记置换法构建 <i>gacA</i> oo突变体流程图 .....	41
图 2-11 标记置换法构建 <i>gacA</i> oo突变体示意图.....	42
图 2-12 pDS132 载体.....	42
图 2-13 PCR 检测 <i>gacA</i> oo 突变体.....	42
图 2-14 互补分析载体pHM1 .....	43
图 2-15 pHrga酶切验证 .....	43
图 2-16 PXO99 <sup>A</sup> 和Δ <i>gacA</i> oo致病性分析 .....	44
图 2-17 PXO99 <sup>A</sup> and Δ <i>gacA</i> oo HR测试.....	44
图 2-18 PXO99 <sup>A</sup> 、Δ <i>gacA</i> oo和Δ <i>gacA</i> oo::C运动性分析.....	44
图 2-19 PXO99 <sup>A</sup> 和Δ <i>gacA</i> oo菌株鞭毛的电镜观察 .....	45
图 2-20 PXO99 <sup>A</sup> 和Δ <i>gacA</i> oo木聚糖酶和纤维素酶活性分析 .....	45
图 3-1 酵母双杂交系统流程图 .....	49
图 3-2 pGBKT7 载体 .....	57
图 3-3 pGBKT7- <i>gacA</i> oo双酶切分析 .....	57
图 3-4 PXO99 <sup>A</sup> 总RNA.....	58
图 3-5 双链cDNA合成.....	58
图 3-6 PCR分析酵母双杂交阳性克隆（部分） .....	59
图 3-7 <i>lacZ</i> 报告基因筛选酵母双杂交阳性克隆 .....	59
图 3-8 Y2H1 酶切分析.....	59
图 3-9 GacAoo与Tdrxoo互作的 <i>lacZ</i> 基因再验证 .....	60
图 4-1 pK18mob载体图 .....	67
图 4-2 pKtdr质粒DNA双酶切分析 .....	67
图 4-3 同源重组单交换突变 <i>tdrxoo</i> .....	67
图 4-4 PCR分析 <i>tdrxoo</i> 野生型和突变体 .....	67
图 4-5 pH <i>tdrxoo</i> 双酶切分析 .....	68

图 4-6 互补菌株中pHtdrxoo双酶切分析 .....	68
图 4-7 GmF/GmR引物PCR检测ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo .....	69
图 4-8 tdrxooF/tdrxooR引物PCR检测ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo .....	69
图 4-9 PXO99 <sup>A</sup> , Δtdrxoo, Δtdrxoo::C和ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo菌株致病性分析 .....	69
图 4-10 PXO99 <sup>A</sup> , Δtdrxoo和ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo菌株HR反应测试 .....	69
图 4-11 PXO99 <sup>A</sup> , Δtdrxoo、Δtdrxoo::C、ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo胞外多糖检测 .....	70
图 4-12 PXO99 <sup>A</sup> , Δtdrxoo、Δtdrxoo::C和ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo菌株运动性分析 .....	70
图 4-13 PXO99 <sup>A</sup> , Δtdrxoo、Δtdrxoo::C菌株鞭毛的电镜观察 .....	71
图 4-14 PXO99 <sup>A</sup> , Δtdrxoo, Δtdrxoo::C, ΔgacA <sub>xoo</sub> /Δtdrxoo菌株纤维素酶和木聚糖酶活性分析 .....	71
图 4-15 PXO99 <sup>A</sup> 及tdrxoo突变体株系和互补株系在M210 和XOM2 培养基中生长曲线测定 .....	72
图 4-16 PXO99 <sup>A</sup> 及其tdrxoo突变体和互补株系Biofilm形成分析 .....	72
图 4-17 Tdrxoo氨基酸序列分析 .....	73
图 4-18 tdrxoo同源性分析 .....	73
图 4-19 tdrxoo基因在黄单胞属细菌基因组中位置分析 .....	73
图 4-20 Tdrxoo在黄单胞属中氨基酸同源性分析 .....	74
图 4-21 tdrxoo核苷酸序列和氨基酸序列分析 .....	76
图 4-22 革兰氏阴性菌中tdr基因的统计分析 .....	77
图 4-23 Tdrxoo/GacA <sub>xoo</sub> 调控途径示意图 .....	80

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
<i>avr</i>	avirulence genes	无毒基因
<i>hrp</i>	hypersensitive response and pathogenicity genes	过敏性反应和致病性基因
TTSS	type III protein secretion system	III 型蛋白分泌系统
ORFs	open reading frames	开放阅读框
RM	restriction-modification	限制-修饰
IS	insertion sequence element	插入序列元件
AHLs	acyl-homoserine lactones	酰基-高丝氨酸内酯
EPS	extracellular polysaccharide	胞外多糖
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
GSP	general secretory pathway	一般分泌途径
HGT	horizontal gene transfer events	基因水平转移的事件
TDR	tonB-dependent receptor	依赖于 TonB 的受体
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
Gm	gentamicin	庆大霉素
CTAB	cetyltrimethyl-ammonium Bromide	十六烷基三甲基溴化铵
GacA	Global antibiotic and cyanide control	抗生素和氰化物全局调控
GacS	global activator sensor kinase	全局激活感应蛋白激酶
HTH	helix-turn-helix	螺旋-转-螺旋
kD	kilodalton	千道尔顿
Kan	kanamycin	卡那霉素
HR	hypersensitive response	过敏性反应
OD	optical density	吸光值
Fur	ferric uptake regulator	铁转运调控子
EDTA	ethylenediamine tetracetic acid	乙二胺四乙酸

# 第一章 绪论

## 1.1 植物—病原细菌的相互作用

大多数植物病原细菌属于革兰氏阴性细菌。主要分属于农杆菌属 (*Agrobacterium*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、雷尔氏菌属 (*Ralstonia*) 和黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 五个属。这些植物病原细菌定殖于植物细胞间, 其病程涉及病原细菌的繁殖、组织间扩散和最终产生典型的病害症状, 如叶片的斑点、叶片或植物枯萎, 果实、根或储藏器官的腐烂等, 对农作物的生产造成严重的危害。

病原细菌和寄主植物经过相当复杂的相互作用后往往产生两种结果: 1. 亲和反应: 病原细菌成功侵染植物并产生症状, 表现为病原细菌的致病和植物的感病。2. 非亲和反应: 不能引起植物病害症状而只是产生侵入点局部组织坏死, 如过敏反应, 植物表现出的病原细菌侵入点及其周围组织的细胞突然死亡, 限制了病原细菌在植物体内的定殖和扩展。在这种情况下, 病原细菌被认为是无毒的, 寄主则是抗性的。

病原细菌致病相关基因是病原细菌在与寄主植物互作过程中, 决定其对寄主植物致病性的基础。它决定着病原细菌在侵染寄主植物过程中与植物建立的寄生关系, 破坏寄主细胞正常的生理代谢功能, 以及调控对寄主的吸附、侵染、定殖、扩展和最终显症等过程。

### 1.1.1 致病因子

#### 1.1.1.1 胞外多糖及脂多糖

植物病原细菌胞外多糖 (EPS) 被认为在阻塞维管束系统, 减少水分运输和保护病原细菌免受寄主防御系统伤害及影响病菌的繁殖、扩展方面起主要作用。王金生等人认为 Xoo 的 EPS 与致病性无关 (王金生, 1999), 但是很多实验室的工作都发现 EPS 合成能力与致病力呈正相关 (Tang *et al.*, 1996a; Lelpi *et al.*, 1993), Xoo 野生型 (BXO1) 和无致病力的 *gumG* 突变体 (BXO1002) 的 EPS 的结构是有区别的 (Katzen *et al.*, 1999), 推测 EPS 的化学结构的特异性影响致病性。*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 的 EPS 合成途径是由许多基因共同控制的 (Kumar *et al.*, 2003), 参与 EPS 合成的酶的基因如 *gum* 或 *xpsI* 基因及调控基因已被克隆和鉴定 (Lelpi *et al.*, 1993)。编码与 EPS 合成的第一阶段单糖转化为糖前体有关的酶的多数基因在染色体上是随机分散的, 仅 *xanA* 和 *xanB* 在染色体上是连续的。由 12 个基因组成的 *xps* 或 *gum* 操纵子 (*gumB-M*) 参与 EPS 合成第二、三阶段糖前体的组装和输出 (Harding *et al.*, 1993)。Gum 操纵子主要以 *gumB* 的启动子开始转录的, 但是在 *gumK* (Katzen *et al.*, 1996) 和 *gumD* (Pollock *et al.*, 1994) 上游存在一个弱启动子。一些 *gum* 基因产物已经在生化水平得以鉴定 (Paulsen *et al.*, 1997), 如 GumK 和 GumI 负责五糖脂类中间体的组装, GumI 为缩酮丙酮酸转移酶, GumF 和 GumG 是乙酰转移酶, GumB、GumC 和 GumE 与 EPS 的聚合及移动相关 (Paulsen *et al.*, 1997)。其它 *gum* 基因虽然还没有鉴定, 但推测可能参与 EPS 的组装和输出。到目前为止, GumE 蛋白仅在 *Xylella fastidiosa* 和 *X. campestris* 中被描述, *X. fastidiosa* GumE 有 11 个跨膜域, 而 *X. campestris* GumE 有 9 个跨膜

域, 推测其为内膜蛋白 (Nakai *et al.*, 1999)。Xcc GumE 突变体能在体外积累完整的五糖亚单位, 但是不能合成聚合体 (Katzen *et al.*, 1999)。在 Xoo 中克隆到与 Xcc *gum* 基因簇高度同源的基因, 另外, 位于 *gum* 基因簇外的两个基因产物为推测的糖核苷异构酶 (putative sugar nucleotide epimerase) 和糖基转移酶 (putative glycosyl transferase) 与 EPS 的合成有关, 而这两个基因在 *Xanthomonas* 属内未见报道 (Dharmapuri *et al.*, 2001)。EPS 的合成受 *rpf* 基因簇的正向调控, 该基因簇上任何一个基因被破坏均影响 EPS 的合成。*X. fastidiosa* 的基因组中存在与 *X. campestris* 的 *gum* 基因簇高度同源的序列, 排列及转录方向都一致, 但没有 *gumG*, *gumI*, *gumJ* 基因。*X. fastidiosa* 的 *rpf* 基因簇则分成了两段。推测 *X. fastidiosa* EPS 的合成具有与 *X. campestris* 相同的机制。

植物病原细菌的脂多糖 (LPS) 在细菌与寄主或非寄主植物互作中的作用机制目前还不甚明确。Newman 等人的研究结果表明, Xcc 的 LPS 能激发甘蓝防卫基因的表达, 并认为脂质 A 为活性成分 (Newman *et al.*, 1995)。同时 Xcc 的 LPS 能诱导烟草的氧迸发反应 (Pugsley *et al.*, 1995)。*R. solanacearum* 的 LPS 能诱导烟草合成一种新的多肽, 而 *P. syringae* pv. *syringae* 的 LPS 是大豆植保素合成的弱激发子 (Lecch *et al.*, 1983)。何晨阳等 (1996) 曾报道, Xoo 引起烟草过敏反应的信号物质为 LPS, 并且活性部分为多糖体部分。但 Minardi 的研究则认为, 用 *P. syringae* pv. *aptata* 的 LPS 预注射接种烟草叶片, 对随后注射接种 *Erwinia amylovora* 的 *hrp* 基因所激发的过敏反应反而有抑制作用 (Minardi *et al.*, 1989)。

### 1.1.1.2 胞外酶

植物病原细菌分泌多种多样的酶到细胞外, 其中与致病相关的酶是植物细胞壁降解酶类, 包括角质酶、果胶酶、纤维素酶、半纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等。这些酶是病原细菌产生的对寄主细胞壁组分具有降解作用的酶类, 在病原细菌侵入、植物组织侵离和细胞死亡中起作用。荧光假单胞菌的胞外蛋白酶具有软化薯块组织的作用, 其作用位点可能是植物细胞壁的糖蛋白。在植物病原细菌中已分别克隆和鉴定编码胞外酶的结构基因和调控基因及与分泌有关的基因。对 *E. chrysanthemi* 中的果胶盐裂解酶基因的研究发现, *pelA*、*pelE* 对致病有重要作用, *pelB*、*pelC* 对致病性有一定影响。茄科假单胞的聚半乳糖醛酸酶蛋白和 28 kD 的胞外蛋白酶研究的较为清楚, 聚半乳糖醛酸酶蛋白和 28 kD 的胞外蛋白酶在致病过程中并非必需的, 推测茄科假单胞在致病过程中可能是由多种蛋白 (包括酶) 共同作用的结果。近来有研究发现 *P. aeruginosa* PA14 所形成的生物被膜与 *pel* 基因簇有关 (Pollock *et al.*, 1994)。几乎所有的植物细胞壁降解酶类都是通过 II 型分泌途径分泌到胞外 (Ray *et al.*, 2000), 如欧文氏菌的果胶酶、纤维素酶, 甘蓝黑腐病菌的蛋白酶、淀粉酶、内聚酶、果胶盐裂解酶等。在植物病原细菌中编码 II 型分泌系统结构的基因有 *E. chrysanthemi* 和 *E. carotovora* 的 *out* 基因, *X. campestris* 的 *xps* 基因, *P. aeruginosa* 的 *xcp* 基因等 (Ray *et al.*, 2000)。II 型分泌系统的基因发生突变, 细菌不能将正常合成的“胞外”酶分泌到胞外, Xcc 的外泌基因 *xpsE*、*xpsF*、*xpsG*、*xpsH*、*xpsI*、*xpsD*、*xpsN* 与胞外酶分泌到胞外有关。*Erwinia* 中先后报道了 12 个 *out* 基因, 与胞外酶穿过外膜的转位作用有关。Xoo 的 II 型分泌系统突变的突变体不能分泌木聚糖酶, 并且引起对水稻的致病力减弱 (Pugsley *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2005)。



### 1.1.1.3 *hrp* 基因

植物病原细菌在寄主植物上的致病作用及在抗病或非寄主植物上引起过敏反应是受 *hrp* 基因控制的。*hrp* 基因最先是通过 Tn5 诱变 *P. syringae* pv. *syringae* 后发现的。*hrp* 突变体既不能引起抗性或非寄主植物的过敏反应，也不能引起寄主植物发病症状。

除了 *Agrobacterium* spp. 外，*hrp* 基因广泛存在于大多数的植物病原细菌中。*hrp* 基因簇可分为两类：一类是大 *hrp* 基因簇，长度为 17-41kb，由 6-8 个转录单元组成。目前已知的除了 *R. solanacearum* 和 *E. herbicola* pv. *gypsophilae* 的 *hrp* 基因簇位于大质粒上 (Zhu *et al.*, 1998; Nizan *et al.*, 2003)，其余的 *hrp* 基因则以呈簇的形式位于病原细菌的染色体上，称致病岛 (pathogenicity island, PAIs)，其两侧具有可交换的效应物座位 (exchangeable effector loci) 和保守效应物座位 (conserved effector loci) 组成 (Alfano *et al.*, 2000)。从 *P. syringae* 的不同菌中分离到了 *hrp* PAIs，PAIs 的 G+C% 通常与基因组水平的不同，暗示着 PAIs 可能是通过基因水平转移获得 (Hacker J *et al.*, 2000)。已有研究证实 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 中 *hrp* 基因簇是通过基因水平转移而获得的。另一类是小的 *hrp* 基因簇 (Xiao *et al.*, 1994; Genin *et al.*, 1992)。两组中操纵子基因序列和调控系统明显不同，组 I *hrp* 操纵子是由 HrpL 激活的 (为  $\delta$  因子 ECF 亚家族的一个成员)，在 *hrpL* 上游存在活化因子 *hrpS* 和 *hrpR*。*hrpL*、*hrpS* 和 *hrpR* 是 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 中 3 个感受植物因子诱导的基因。HrpS 与调控蛋白 NtrC 家族成员高度同源，调节所有转录单元的表达；HrpL 是该菌第二个调节产物，调节至少 3 个操纵子的表达；HrpR 自身虽不能激活 *hrp* 基因的表达，却能修饰调节其它组分。HrpV 是 *P. syringae* *hrp* 基因的负调控因子 (Preston *et al.*, 1998)。而大多数组 II *hrp* 操纵子是由 AarC 家族的成员激活的，*R. solanacearum* 中为 HrpB (Vasse *et al.*, 2000)，*X. campestris* 中为 HrpX (Wengelnik *et al.*, 1996)。在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 中 HrpX 的表达可被 HrpG (一个双组分调控系统 OmpR 家族的调节蛋白) 激活。在基因组水平上研究发现 HrpG 能调控 *hrp* 基因和编码外膜蛋白的基因。受 *hrpX* 调控的 *hrp* 基因启动子处都存在一个保守的植物诱导型启动子盒 (Plant-Inducible-Promoter, PIP) (TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC)，然而不受 *hrpX* 调控的基因也存在 PIP 盒。

植物病原细菌 *hrp* 基因在丰富培养基中培养时不表达或表达很低，而在基本培养基或植物组织外植体大量表达。另外 *hrp* 基因表达还受不同碳源和氮源、pH 值、温度和某些植物信号分子的影响。但环境及营养条件对 *hrp* 基因的表达并不完全相同。如酸性环境 (pH 5.5-5.7) 可诱导丁香假单胞菌和梨火疫欧文氏菌的 *hrp* 基因的大量表达，却强烈抑制 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 的 *hrp* 基因的表达。

*hrp* 基因和编码 *Yersinia* 毒性蛋白分泌系统成分的基因具有同源性 (Fenselau *et al.*, 1992)，这也表明在革兰氏阴性植物病原细菌和动物病原细菌中存在保守的蛋白分泌系统 (Salmond *et al.*, 1993; Colla *et al.*, 1997)。进一步的序列测定分析揭示了同源性 *hrp* 基因的广泛存在，同时导致 *hrp* 基因命名上的两大变化：(1) 对存在于 *Pseudomonas*、*Erwinia*、*Xanthomonas*、*Yersinia*、*Salmonella*、*Shigella* 中保守性强的 *hrp* 基因重新命名为 *hrc* (HR and conserved) (Alfano *et al.*, 1997)。(2) *hrp* 基因的概念扩大化，包括植物病原细菌不能引起典型 *hrp* 基因表型反应的突变基因的同源基因。

#### 1.1.1.4 III 型分泌系统

植物病原细菌要达到引起寄主病害的目的,那么它们首先要能够侵染寄主,并在寄主体内生长繁殖。为了达到这个目的,病原细菌需要克服寄主的免疫防卫反应。对于几个革兰氏阴性病原细菌属的致病菌来说,它们是通过一条特殊的蛋白分泌途经即III型分泌系统把抗寄主因子注入寄主细胞原生质 (Alfano *et al.*, 1997)。其它一些病原细菌则利用III型分泌系统来破坏上皮组织或侵染特定的寄主细胞 (Colla *et al.*, 1989)。

DNA 序列分析表明,许多植物病原细菌的 *hrp* 基因与人类和动物病原细菌的某些基因极为相似,这些结果似乎表明了无论动物病原细菌或植物病原细菌,其致病性基因在功能上,甚至有关的作用机制有着不可忽视的共性。

病原细菌通过这种蛋白质传递方式得以大量进入寄主靶标。III型分泌系统对于病原细菌致病重要性是通过该系统有关基因的缺失而引起致病性丧失发现的 (Kamata *et al.*, 1988)。不同的病原细菌中,III型分泌系统结构成分是高度保守的 (Ilueck *et al.*, 1998),其系统结构组分至少可分为两类:一类是外膜蛋白,其中包括和运输蛋白家族系列同源的一种蛋白质成分以及保守性较低的脂蛋白;另一类由几个内膜蛋白组成,与鞭毛输出器高度同源。

由III型分泌系统分泌出的毒性因子主要有Harpin、Vir(Avr)和Dsp等。已从*E. amylovora*、*P. syringae* pv. *syringae*、*R. solanacearum*和*E. chrysanthemum*分离出激发子蛋白Harpin<sub>Ea</sub>、Harpin<sub>Pss</sub>、PopA和Harpin<sub>Ech</sub>,除PopA1外均由*hrp*基因编码,Harpin<sub>Ea</sub>由*hrpN*编码,Harpin<sub>Pss</sub>由*hrpZ*编码,Harpin<sub>Ech</sub>由*hrpN<sub>Ech</sub>*编码 (Arlat *et al.*, 1994)。Harpins具有共同的特性:缺少半胱氨酸而富有甘氨酸的蛋白,在培养基中当Hrp系统表达时被分泌出,热稳定,具亲水性,缺少N末端信号肽,能激发HR。*hrp*基因一般接近各自的*hrp*基因簇,而*hrpZ*位于*hrp*操纵子内。研究表明harpins在决定寄主范围方面具有潜在作用,但对致病力的影响还缺乏证据。

Avr介导了含相应抗性基因的植物抗病反应 (Leach *et al.*, 1996)然而关于大部分 *avr* 基因的生化功能还不清楚。在细菌中, *avr* 基因的表达需要 *hrp* 基因 (Collmer *et al.*, 2000; Keen *et al.*, 1990)。在 *hrp* 突变体中,表达的 *avr* 基因不能引起症状,同时在缺乏 *hrp* 分泌系统的非病原细菌如 *E. coli* 中也不能引起过敏反应 (高量表达的 *avrD* 例外) (Dangi *et al.*, 1994)。对于许多 *avr* 基因,一个简单的解释是他们的表达依赖于 Hrp 调节因子 (Huynh *et al.*, 1989)。然而,载体启动子的 *avr* 基因的表达也需要功能性 Hrp 系统,可见 Hrp 蛋白与 Avr 蛋白之间存在相互依赖性。*avrBs3* 相关基因的活性依赖于III型分泌系统 (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Buttner *et al.*, 2002; Rossier *et al.*, 1999; Mudgett *et al.*, 2000; Rossier *et al.*, 2000; Escobar *et al.* 2001)。*avrBs3* 基因家族编码的蛋白 C 端都具有对无毒基因的功能起关键作用的结构,即 C 端的 3 个核定位信号序列 (Nuclear localization sequence, NLS),这些 NLS 是高度保守的,其失活会导致无毒基因功能的丧失 (Ackerveken *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1995),其 N 端与该蛋白的分泌有关。已经有证据证实 X. *campestris* pv. *vesicatoria* 侵染后的 4 小时能在辣椒叶片细胞核中探测到 AvrBs3 蛋白 (Szurek *et al.*, 2002; Marois *et al.*, 2001),当然,许多细菌的 Avr 蛋白的作用位点是在细胞质中。从 Xoo 中克隆的四个无毒基因 *avrXa7*、*avrXa10*、*avrXa4*、*avrXa5* 都属于广泛存在于 Xoo 的 *avrBs3* 基因家族的成员 (Herbers *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1998)。在 *avrXa10* 的 C 末端发现了 1 个原来只在原核生物

中存在的酸失活转录功能域,它对 *avrXa10* 编码的无毒基因的功能起重要作用。中心结构域重复单元的数目和顺序决定无毒基因对抗性寄主植物的专化性,其中 *avrXa7* 和 *avrXa10* 分别包括 25 个和 15 个重复。*avrXa7* 和 *avrXa10* 虽具有很高的同源性,但它们分别与不同的水稻品种互动而激发过敏性反应。新的无毒专化性可通过改变重复的数目或碱基对的组成而实现 (Vivian *et al.*, 2000; Herbers *et al.*, 1992)。在对 Xoo 的 AvrXa21 蛋白的研究中发现,硫酸对 AvrXa21 蛋白的活性起关键作用,可能是涉及到 AvrXa21 效应子的合成或调控 AvrXa21 效应子的表达。

另外还发现许多Ⅲ型分泌蛋白不同的种中需要小的、通常是酸性的细胞质辅助蛋白,特异性地结合到各自的分泌蛋白上,目的是提高分泌蛋白在分泌前及分泌时的稳定性。如 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 中 HopPtoM 的分泌与移动依赖Ⅲ型分泌伴侣分子 (Bade *et al.*, 2003; Anne *et al.*, 2002)。

#### 1.1.1.5 毒素

植物病原细菌毒素是指植物病原细菌产生的一类小剂量即可对植物造成伤害的小分子化合物,这些化合物是细菌的次级代谢产物,能在植物体内扩散,并在远离细菌生长繁殖的部分使植物出现失绿或坏死的症状 (Gross, 1991; Bender *et al.*, 1999)。

植物病原细菌中能产生毒素的病原菌主要是假单胞属 (*Pseudomonas*) 细菌。如烟草原火病假单胞菌 (*P. syringae* pv. *tabaci*) 产生烟草毒素 (tabtoxin)、意大利黑麦草巧克力斑病菌 (*P. syringae* pv. *atropurpurea*) 产生冠毒素,丁香假单胞 (*P. syringae* pv. *syringae*) 产生丁香菌素 (Syringomycin)、万寿菊叶斑假单胞菌 (*P. syringae* pv. *ageris*) 产生万寿菊毒素、菜豆晕斑病菌 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) 产生菜豆毒素等。绝大多数病原细菌的毒素只是与病菌毒性有关,而不是致病所必须的,这些毒素只是与某些症状的产生、发展或病原细菌在寄主体内的生长繁殖有关。

#### 1.1.1.6 生长激素

一些植物病原细菌能产生植物激素 (Costacurta *et al.*, 1995), 这些对植物生长有调节作用的活性物质具有双重效应,浓度适当时促进植物生长,浓度过高时则对植物有害。激素在植物病害中的作用是影响症状的总体表现即综合症 (syndrome)。目前已知假单胞菌属、黄单胞菌属、土壤杆菌属等细菌能够产生生长素,土壤杆菌属、红球菌属等细菌能产生细胞分裂素,细胞分裂素不仅影响病原细菌的致病力,而且还影响到病原细菌的寄主范围。此外,还发现多种病原细菌能在培养基中产生乙烯,病原细菌侵染寄主后,寄主一些症状的出现已被证明与乙烯有关,如青枯菌所造成的青枯病。

### 1.1.2 植物病原细菌的早期侵染事件

植物病原细菌趋化、吸附、定殖和侵入的早期侵染过程是病原菌成功侵染植物的第一步和关键一步,然而目前关于植物病原细菌早期侵染的研究较少,机制还不清楚 (VandeBroek *et al.*, 1995)。植物病原细菌依赖于细胞表面上毒力因子来促进其在寄主植物上的吸附和细菌群体在植物上的定殖,这些毒力因子包括Ⅳ纤毛、非编码纤毛的 adhesins、鞭毛及能感知环境信号的趋化系

统。

在革兰氏阴性细菌中普遍存在的黏附结构是被称为纤毛 (Manning *et al.*, 1997)、fimbriae 的细丝状的附加体 (Kang *et al.*, 2002) 如 *E. raphanistrum*, *E. carotovora*, *P. syringae* (Hienonen *et al.*, 2002), *X. campestris* (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997), *R. solanacearum* 的 fimbriae, *P. syringae* 的 IV 型纤毛 (Rome *et al.*, 1998), *R. solanacearum* 的脂多糖。该黏附结构除了具有黏附功能外, 还调控细菌的颤搐运动和生物被膜的形成 (Manning *et al.*, 1997; Wall *et al.*, 1999; Merz *et al.*, 2000)。细菌的黏附结构在动物病原细菌中起非常重要的作用, 而在植物病原细菌中的作用还有争议 (Beattie *et al.*, 1994)。*X. campestris* 和 *P. syringae* pathovars 的几个致病变种中的 IV 型纤毛能增强其在叶表面上的黏附能力和忍受紫外光能力 (Mazurnder *et al.*, 1999)。IV 型纤毛能促进 *R. solanacearum* 在马铃薯上的致病和控制该菌的颤搐运动 (Liu *et al.*, 2001)。*P. syringae* 的 IV 纤毛和 *X. campestris* 的 *fim* 基因编码的 fimbriae 能调控细菌的聚集 (Ojanen *et al.*, 1997)。*X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000) 和 *R. solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002) 基因组中存在编码 adhesins 的多个基因, 其中 *R. solanacearum* 的 14 个与 *Bordetella pertussis* 的丝状红血球凝集素 (filamentous hemagglutinin, FHA) 同源, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* 编码 FHA 的 *hecA* 基因在对拟南芥的致病过程中起重要作用, 该基因与编码 III 型分泌系统的基因相邻 (Ham *et al.*, 2002)。在 Xoo 中发现与动物致病菌 *Yersinia* 编码 non-fimbrial adhesins 的 YadA 同源的 XadA 蛋白, 表明在植物病原细菌中存在与动物病原细菌类似的毒力因子在吸附过程起作用 (Ray *et al.*, 2002)。

游动性是细菌毒性的一种决定因子, 而细菌的鞭毛是决定游动性的工具。由于细菌的主动游动行为, 所以一般认为细菌的侵入主要是通过自然孔口如气孔、水孔和蜜腺及伤口。研究梨火疫欧氏杆菌致病和不致病细菌鞭毛发育时, 发现毒性菌株 10 小时就可以长出正常的鞭毛, 而无毒菌株的鞭毛则少而短, 因此致病菌株在鞭毛的发育上具有优势。比较菜豆假单胞的游动菌株从气孔侵染引起的病斑是不游动菌株的 12 倍。但这并不表明游动性的丧失就一定丧失致病性。Xoo 是具有端生鞭毛的有运动性的细菌, 在基本培养基上能诱导其鞭毛运动性, Xoo 能趋向于水稻感病品种的分泌物, 但对抗病品种不能作出反应。编码鞭毛的基因在植物病原细菌中相继发现和鉴定, 在 *P. aeruginosa* 中鞭毛合成有关的基因 *fliMNOP* 与该细菌的运动和黏附有关。在 Xoo 中克隆和鉴定了编码鞭毛蛋白的基因 *flhB*、*flhA*、*flhF* 和 *fliA*, 鞭毛蛋白 FlhF 有两个跨膜域, 该基因插入突变体的运动性受延迟但并没有丧失 (Shen *et al.*, 2001)。*E. amylovora*、*P. phaseolicola* 和 *P. syringae* pv. *glycinea* 的不能运动的突变体均降低了侵入寄主植物的能力, 但是通过直接注入方法将突变体送入植物体内时致病性不受影响 (Bayot *et al.*, 1986; Hatterman *et al.*, 1989; Panapoulos *et al.*, 1974; Taguchi *et al.*, 2003)。*P. syringae* 的 *fliC* 突变体不仅运动性丧失, 而且导致在寄主植物上的致病性降低并且在非寄主植物上不能诱导过敏反应, 鞭毛蛋白的翻译后修饰在该菌的过敏反应中起重要作用, *P. syringae* pv. *tabaci* 的鞭毛蛋白单体扮演着一个强的激发子诱导非寄主植物与过敏反应相关的细胞死亡 (Shimizu *et al.*, 2003)。

### 1.1.3 植物病原细菌致病因子的调控机制

植物病原细菌的致病因子受到严谨的调控, 其表达受不同环境信号的调节。在长期的进化过程中, 植物病原细菌形成一个复杂的调控机制对不同环境作出反应, 以至于不必在不需要的情况

下消耗能量。病原细菌一旦遇到寄主植物并感受到某种生化和物理的信号如温度的增加、pH 值的变化, 毒性因子的一系列级联反应就被诱导。在侵染循环的每一步, 病原细菌都有不同的基因开始表达, 而另一些则被关闭。在一些病原细菌中, 许多不相关基因的表达还受到单一控制组件的调控, 其中包括毒性因子的诱导表达, 这种调节方式就叫全局性调控 (global regulatory)。某一阶段起作用的基因被破坏都可能导致病原细菌致病力的下降或丧失。要全面了解植物病原细菌的致病机制, 就不能简单孤立地研究某个基因, 而应从植物病原细菌的侵染循环以及侵染的整体过程考虑。

双组分调控系统 (two-component regulatory system) 是普遍存在于细菌中, 调控基因表达而使细菌更好地适应环境的系统 (Nixon *et al.*, 1986), 在许多情况下植物病原细菌也应用这种系统使自己更好地“利用植物”来生存。典型的双组分调控系统由两个蛋白组成, 一个叫组氨酸激酶传感蛋白或感应蛋白 (Sensor Histidine Kinase, HK), 通常是跨膜蛋白; 另一个是效应调节蛋白 (Response Regulator, RR), 通常位于细胞质中, 两者分别由两个不同的基因编码, 即分属于不同的蛋白质家族。组氨酸激酶传感蛋白家族成员的 C 末端 250 个氨基酸高度同源, 而效应调节蛋白家族成员的 N 末端 120 个氨基酸高度保守。一般是传感蛋白通过 N 末端感受环境信号后, 用 ATP 的磷酸基团供体将自己保守的 C 末端一个组氨酸残基磷酸化, 然后通过某种机制将这个磷酸基团 (脱磷酸化) 传递到调节蛋白保守的 N 末端一个天冬氨酸残基, 调节蛋白 N 末端磷酸化引起 C 末端构象改变, 使得调节蛋白被活化后进而调节靶基因的表达 (Stock *et al.*, 1989; Albright *et al.*, 1989; Swanson *et al.*, 1994)。

已从植物病原细菌中克隆、鉴定了许多调控致病性相关基因表达的双组分系统, 它们往往又和其它调控系统一起组成复杂的网络 (Network), 全局性或部分地调控有关基因的表达。根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 调控致病性基因表达的双组分调控系统有 ChvG/ChvI (Charles and Nester, 1993) 和 VirA/VirG (Shaw *et al.*, 1988), 其中 VirA/VirG 是被研究得最多也最深入。VirA 是传感蛋白, 它感受植物伤口的酚类物质后, 通过自动磷酸化将磷酸基团传到调节蛋白 VirG, 活化 VirG 和所有 *vir* 基因的表达。茄科假单胞菌 (*R. solanacearum*) 至少有两个双组分调控系统 (VsrA/D 和 VsrB/C), 调控重要毒性因子胞外多糖组分 I 的合成 (Schell, 2000)。丁香假单胞菌 (*P. syringae* pv. *syringae*) 毒素 syringomycin、胞外蛋白酶的产生及病症的发展受 LemA/GacA 调控 (Rich *et al.*, 1994)。*hrp* 基因的表达也受双组分调控系统的调控, 如丁香假单胞菌菜豆致病变种 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) 和丁香致病变种 (*P. syringae* pv. *syringae*) 的 *hrp* 基因表达分别受各自的 HrpR/HrpS 调控, HrpR/HrpS 分别是感受蛋白和调节蛋白 (Grimm *et al.*, 1995; Xiao and Hutcheson, 1994)。辣椒斑点病菌 (*X. campestris* pv. *vescatoria*) 体内只发现了起调节作用的 HrpG, HrpG 激活所有 *hrp* 基因的表达 (Wengelnik *et al.*, 1996)。野油菜黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 的 *rpfC* 基因同时与双组分调控系统的感受蛋白、调节蛋白的保守区同源, 和 *rpfC* 相隔一个基因的 *rpfG* 编码的产物与调节蛋白具有高度同源性, 尽管 *rpfC* 或 *rpfG* 的失活均使该病菌的毒性因子 (胞外多糖、胞外酶) 的产量大大减少, 致病性显著降低, 但 RpfC 和 RpfG 是否真正在细胞中是相互作用的感受蛋白和调节蛋白还有待于进一步研究 (Tang *et al.*, 1991; Dow *et al.*, 2000)。

一定数量的病原细菌群体的发展常常是病原细菌引起植物病害的重要因素。已发现胡萝卜软腐欧文氏菌 (*E. carotovora*)、斯氏泛菌 (*Pantoea stewartii*)、茄科假单胞菌 (*R. solanacearum*)、

丁香假单胞菌 (*P. syringae*)、野油菜黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 通过细胞—细胞间信号交换, 即“群体感应” (Quorum Sensing) 来调控毒性基因的表达, 在细胞间可扩散的小分子物质在这种“群体感应”系统中起决定性作用 (Brelles *et al.*, 2001; Von Bodman *et al.*, 2003)。上面提到的前两种病菌中起作用的可扩散小分子为酰基高丝氨酸内脂类化合物 (N-acyl Homoserine Lactone, AHL), 这类物质是许多革兰氏阴性细菌对细胞密度作出的反应而诱导特定基因表达过程中所用的可扩散分子 (Winson *et al.*, 1998)。茄科假单胞菌 (*R. solanacearum*) 的信号分子可能是 3-OH-PAME (3-Hydroxypalmitic Acid Methyl Ester), 而黄单胞菌属的两个变种可能是用不同于酰基高丝氨酸内脂类的物质来调控胞外酶和胞外多糖产生的 (Flavier *et al.*, 1997; Barber *et al.*, 1997)。目前的研究表明, 群体感应系统是革兰氏阴性细菌整个基因调控网络中不可或缺的一环, 细菌通过它更有效地适应外界环境的改变, 同时, 由于其与细菌致病力的产生密切相关, 本身的机制又高度保守, 所以有可能作为病害防治的靶标, 从而开辟一条防治细菌病害的新途径 (Dong *et al.*, 2001)。

## 1.2 致病相关基因的突变方法

在植物病害致病分子机理的研究中, 已采取的实验技术很多, 这里只扼要介绍一些用于突变致病相关基因的实验技术。

### 1.2.1 诱变

分离和研究突变体是遗传学研究的两块基石, 在植物病原细菌致病分子机理的研究中, 常通过诱变野生型菌株, 然后接种诱变菌, 在寄主植物上筛选不致病的突变体。常用的诱变方法有化学诱变和转座子诱变。

#### 1.2.1.1 化学诱变

在化学诱变中, 最常用的诱变剂是甲基磺酸乙酯 (EMS), 该物质是一种很强的化学诱变剂, 可导致 DNA 点突变、染色体断裂及染色体突变。点突变主要是鸟嘌呤烷基化引起 GC/AT 转换的结果。EMS 在细胞培养实验中的一般使用浓度为 0.05%—0.5%, 处理时间为 1—1.5 小时。化学诱变的缺点是常产生多点同时突变, 影响了对突变体的分析; 另一方面由于缺少选择标记, 突变体的后续分析工作量十分浩大而且困难。优点是不受寄主限制修饰系统的影响, 对任何细菌都适用, 且能在短时间内获得大量突变体。

#### 1.2.1.2 转座子诱变

转座子是一段可以跳跃的遗传成分, 它具有一段可供选择的抗菌素抗性基因。它们作为诱变剂具有很大的优点, 已被广泛应用在体内 (*in vivo*) 和体外 (*in vitro*) 遗传操作上 (Berg and Howe, 1989)。Voelker和 Dybvig (1998) 综述了转座子在植物病原细菌研究上的应用, 转座子诱变在植物病理学上具有下面三方面的优点: ①由于转座子上含有可供选择的抗生素抗性基因, 使得突变体容易被鉴定和进行体内操作, 而不需要考虑野生型和突变体的表型; ②因为DNA片断连接着一

段已知的DNA序列（即转座子序列），因而携带有转座子突变基因片段可以通过杂交或基于PCR的方法（如TAIL-PCR）或质粒拯救确定；③转座子诱导的突变往往具有极性，同一操纵子中由于转座子的插入使突变基因下游的基因都完全丧失功能。

通过一个包括受体 DNA、转座子和转座酶的简单反应就可在体外实现转座（Lampe *et al.*, 1996; Goryshin *et al.*, 1998; Haapa *et al.*, 1999）。体外转座的一个应用就是用于常规鸟枪法难以奏效的长片段测序（Devine *et al.*, 1994）。此法也可用于细菌全基因组测序和基因功能的确定（Reich *et al.*, 1999）。此后发展起来的基因组分析的体外转座（Genomic Analysis and Mapping by in Vitro Transposition, GAMBIT）（Akerley *et al.*, 1998）就是一种体外转座的方法，具体过程如下：把包含多个 ORFs 的 PCR 片段作为体外转座的受体，在体外实现转座后把包含转座子的 PCR 片段转化到寄主细胞内，通过同源重组整合到寄主染色体上。然后用一对与转座子及相应 ORF 的特异引物扩增所得的突变体，其中不能有效扩增到产物的 ORF 就是生长必须的，因为它的突变使细菌不能正常生长。而特征标签转座（Signature Tagged Mutagenesis, STM）（Hensel *et al.*, 1995）是一种体内（in vivo）转座方法，STM 利用一段通过 PCR 扩增得到的序列作为每次转座的标签，带有标签的转座突变体被分成不同的池（Pool）去接种寄主。从寄主中分离接种的细菌，通过 PCR 获得标签，作为探针从接种前的突变体文库中找出相应的克隆。它的首要条件是转座子的插入不会影响细菌的存活，用 STM 只能筛选到对细菌在特定寄主或寄主组织中生长必须的基因（细菌的毒性基因）。通过筛选在不同生境下的 STM 突变体可能发现对寄主适应性必须的致病因子（Tsolis *et al.*, 1999, Coulter *et al.*, 1998）。

转座体（Transposome<sup>TM</sup>）的出现把体外和体内转座联系到一起（Goryshin *et al.*, 2000）。转座体是转座子和转座酶在转座早期形成的复合物。当不存在受体DNA和 $Mg^{2+}$ 时，这个复合物能在体外稳定存在，当转座体通过电转化导入细菌细胞- $Mg^{2+}$ 存在的环境中时，转座酶被激活，在细胞内发生转座（Goryshin *et al.*, 2000）。它已成功的应用于*E. coli*（Goryshin *et al.*, 2000）、*Xylella fastidiosa*（Guilhabert *et al.*, 2001）及另三种革兰氏阴性菌中（Hoffman *et al.*, 2000）。

## 1.2.2 标记置换（Marker Exchange）

标记置换，有时也称为定点突变，它是通过含有转座子的重组质粒来定位和“定点”（Site-directed）诱变野生型菌株，它涉及必须分别转移每一个重组突变质粒到野生型菌株中，在每个细菌细胞内，细菌染色体组中有一部分 DNA 与重组克隆中的同源 DNA 之间发生重组，通过双交换或单交换实现“标记置换”，也就是说，将转座子转移到基因组的相应位置。在遗传操作过程中，一般是利用质粒的不兼容性来分离标记置换突变体。因而，产生一系列新的含有单个转座子插入的突变体，在染色体上插入的位置是和克隆的 DNA 片段预先标记的位置相对应。标记置换具有以下两个方面的主要用途：①可以检测相连或成簇的基因；②每一个标记置换突变体与野生型菌株唯一的差别是含有一个拷贝的转座子插入，因而，我们可以确信在相同的遗传背景下，表型的改变是由插入某一位置的基因或操纵子的突变引起，而不是由其它的因素所引起。

### 1.2.3 基因的转移

基因转移主要有三种方式，一是接合（Conjugation），有些本身不能转移的广谱载体，因本身不带转移基因，自身不能在细胞间转移，只能在含有转移基因的辅助质粒（Helper Plasmid）帮助（反式作用）下，通过三亲本结合（Triparental Matings）的方式实现在不同细菌间的有效转移。有些质粒，本身带有mob基因，当编码转移功能的基因整合进寄主菌株以后（如*E. coli* S17-1），质粒的转移可以在两亲本之间进行，即两亲本结合（Biparental Matings）。基因转移的第二种方式是转化（Transformation），应用最广泛的转化方式是电转化，即电穿孔（Electroporation），此法已很成熟，能以较高频率将质粒DNA导入不同属的细菌。在野油菜黄单胞菌（*X. campestris* pv. *campestris*）中，电转化的转化效率一般在 $10^8$ 和 $10^9$ 转化子/ $\mu\text{g}$  DNA（White and Gonzalez, 1991），因此电转化是一种很有效的基因转移方法。与接合相比，电转化实现基因转移还有一个优点，转移后形成的转化体插入位点各不相同，插入同一位点克隆的几率很小，而这一点对有些实验是很关键的。第三种方法是转导（Transduction），尽管许多病原细菌的噬菌体已经描述和鉴定（Swings *et al.*, 1993），但目前仍没有具有遗传操作用途的噬菌体报道。

## 1.3 酵母双杂交系统的发展及应用

随着对多种重要生物的大规模基因组测序工作的完成，基因工程领域又迎来了一个新的时代——功能基因组时代。它的任务就是对基因组中包含的全部基因的功能加以认识。生物体系的运作与蛋白质之间的互相作用密不可分，例如：DNA合成、基因转录激活、蛋白质翻译、修饰和定位以及信息传导等重要的生物过程均涉及到蛋白质复合体的作用。能够发现和验证在生物体中相互作用的蛋白质与核酸、蛋白质与蛋白质是认识其生物学功能的第一步。

酵母双杂交（yeast two hybrid, Y2H）系统作为发现和研究在活细胞体内蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术平台，在近几年来得到了广泛应用。Y2H是在真核模式生物酵母中进行的，研究活细胞内蛋白质相互作用，对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测得到，是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。大量的研究文献表明，Y2H既可以用来研究哺乳动物基因组编码的蛋白质之间的互作，也可以用来研究高等植物基因组编码的蛋白质之间的互作。因此，它在许多研究领域有着广泛的应用。

Y2H的建立是基于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。反式转录激活因子，例如酵母转录因子GAL4在结构上是组件式的（modular），往往由两个或两个以上结构上可以分开，功能上相互独立的结构域（domain）构成，其中有DNA结合功能域（DNA binding domain, DNA-BD）和转录激活结构域（activation domain, DNA-AD）。这两个结构域将它们分开时仍分别具有功能，但不能激活转录，只有当被分开的两者通过适当的途径在空间上较为接近时，才能重新呈现完整的GAL4转录因子活性，并可激活上游激活序列（upstream activating sequence, UAS）的下游启动子，使启动子下游基因得到转录。

根据这个特性，将编码DNA-BD的基因与已知蛋白质（诱饵蛋白，Bait protein）的基因构建在同一个表达载体上，在酵母中表达两者的融合蛋白BD-Bait protein。将编码AD的基因和cDNA文库的基因构建在AD-LIBRARY表达载体上。同时将上述两种载体转化改造后的酵母，这种改造



后的酵母细胞基因组中既不能产生 GAL4, 又不能合成 LEU、TRP、HIS、ADE, 因此, 酵母在缺乏这些营养的培养基上无法正常生长。当上述两种载体所表达的融合蛋白能够相互作用时, 功能重建的反式作用因子能够激活酵母基因组中的报告基因 HIS、ADE、LACZ、MEL1, 从而通过功能互补和显色反应筛选到阳性菌落。将阳性反应的酵母菌株中的 AD-LIBRARY 载体提取分离出来, 从而对载体中插入的文库基因进行测序和分析工作。在酵母双杂交的基础上, 又发展出了酵母单杂交、酵母三杂交和酵母的反向杂交技术。它们被分别用于核酸和文库蛋白之间、三种不同蛋白之间的互作研究以及两种蛋白相互作用的结构和位点的研究。

基于 Y2H 平台的特点, 已在许多研究工作当中得到应用。

### 1、发现新的蛋白质和蛋白质的新功能

Y2H 已经成为发现新基因的主要途径。当我们将已知基因作为诱饵, 在选定的 cDNA 文库中筛选与诱饵蛋白相互作用的蛋白, 从筛选到的阳性酵母菌株中可以分离得到 AD-LIBRARY 载体, 并从载体中进一步克隆得到随机插入的 cDNA 片段, 并对该片段的编码序列在 Genebank 中进行比较, 研究与已知基因在生物学功能上的联系。另外, 也可作为研究已知基因的新功能或多个筛选到的已知基因之间功能相关的主要方法。例如: Engelender 等人 (2006) 以神经末端蛋白 alpha-synuclein 蛋白为诱饵蛋白, 利用酵母双杂交 CLONTECH MATCHMARKER SYSTEM 3 为操作平台, 从成人脑 cDNA 文库中发现了与 alpha-synuclein 相互作用的新蛋白 Synphilin-1, 并证明了 Synphilin-1 与 alpha-synuclein 之间的相互作用与帕金森病的发病密切相关。为了研究两个蛋白之间相互作用的结合位点, 找到影响或抑制两个蛋白相互作用的因子, 又利用 Y2H 和基因修饰证明了 alpha-synuclein1-65 氨基酸残基和 Synphilin-1 的 349-555 氨基酸残基之间是相互作用的位点, 研究它们之间的相互作用位点有利于基因治疗药物的开发。

### 2、在细胞体内研究抗原和抗体的相互作用

酶联免疫 (ELISA)、免疫共沉淀 (CO-IP) 技术都是利用抗原和抗体间的免疫反应, 研究抗原和抗体之间的相互作用, 但是, 它们都是基于体外非细胞的环境中研究蛋白质与蛋白质的相互作用。而在细胞内的抗原和抗体的聚积反应则可以通过酵母双杂交进行检测。例如: 在来源于矮牵牛的黄烷酮醇还原酶 DFR 与其抗体 scFv 的反应中, 抗体单链的三个可变区 A4、G4、H3 与抗原之间作用有强弱的差异, Geert 等 (2006) 利用 Y2H, 将 DFR 作为诱饵蛋白, 编码抗体的三个可变区的基因分别被克隆在 AD-LIBRARY 载体上, 将 BD-BAIT 载体和每种 AD-LIBRARY 载体分别转化改造后的酵母菌株中, 并检测报告基因在克隆的菌落中的表达活性, 从而在活细胞的水平上检测抗原和抗体的免疫反应。

### 3、筛选药物的作用位点以及药物对蛋白质之间相互作用的影响

酵母双杂交的报告基因能否表达在于诱饵蛋白与靶蛋白之间的相互作用。对于能够引发疾病反应的蛋白互作可以采取药物干扰的方法, 阻止它们的相互作用以达到治疗疾病的目的。例如: Dengue 病毒能引起黄热病、肝炎等疾病, 研究发现其病毒 RNA 复制与依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (NS5) 与拓扑异构酶 NS3, 以及细胞核转运受体 BETA-importin 的相互作用有关。研究人员通过 Y2H 找到了这些蛋白之间相互作用的氨基酸序列。如果能找到相应的基因药物阻断这些蛋白之间的相互作用, 就可以阻止 RNA 病毒的复制, 从而达到治疗这种疾病的目的 (Mastrangelo *et al.*, 2007)。

#### 4、建立基因组蛋白连锁图 (Genome Protein Linkage Map)

众多的蛋白质之间在许多重要的生命活动中都是彼此协调和控制的。基因组中编码蛋白质的基因之间存在着功能上的联系。通过基因组的测序和序列分析发现了很多新的基因和 EST 序列, Hua 等人 (1998) 利用 Y2H, 将所有已知基因和 EST 序列为诱饵, 在表达文库中筛选与诱饵相互作用的蛋白, 从而找到基因之间的联系, 建立基因组蛋白连锁图。对于认识一些重要的生命活动: 如信号传导、代谢途径等有重要意义。

#### 5、在植物—病原物互作研究中的应用

Tang 等 (1996b) 采用 Y2H 研究抗病蛋白 Pto 与其相应的无毒蛋白 AvrPto 相互作用, 二者的直接结合互作为“基因—基因学说”提供了最为直接的分子证据; 在 Xoo 基因组中, Shen 等 (2001) 研究发现 *flhF* 位于鞭毛基因簇, FlhF 具有 GTP 结合保守结构域和两个跨膜结构, 突变 *flhF* 可导致 Xoo 运动能力急剧减弱, 利用 Y2H 发现 FlhF 为抗病蛋白 Xa21 的作用底物; Khater 等 (2007) 通过 Y2H 鉴定到了 *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) 基因组中 XAC1990 为泌出伴侣基因 *flgN*, FlgN 与鞭毛蛋白 FlgK 和 FlgL 结合互作, 在鞭毛的正确组装过程中具有重要作用。

尽管 Y2H 已被证实是分析蛋白与蛋白间相互作用的有效和快速的方法, 有着多方面的应用, 但仍存在一定的局限性。首先, 它并非对所有蛋白质适用, 这是由其原理所决定的。双杂交系统分析蛋白间的相互作用定位于核内, 而许多蛋白间的相互作用依赖于翻译后加工, 如糖基化、二硫键形成等, 这些反应在核内无法进行。另外, 有些蛋白的正确折叠和功能有赖于其它非酵母蛋白的辅助, 这限制了某些细胞外蛋白和细胞膜受体蛋白等的研究。虽然目前已经在表达质粒中插入了核定位序列, 但也不能排除有些必须在胞质中进行翻译后加工修饰的蛋白, 尤其是胞外蛋白不能进入核内, 有时也会因产生错误构象而影响筛查结果。其次, 是假阳性的发生。Vidalain 等人 (2004) 将筛库过程中遇到的假阳性分为两类: 一类是“生物学”上的假阳性, 即蛋白质与蛋白质的相互作用在酵母细胞中发生, 但是在其生物体细胞内并不发生相互作用。这主要是因为两种蛋白不同时表达或者二者根本不在同一组织中。我们如果对所研究蛋白质的生物学特性没有深入了解的话, 这种假阳性是很难排除的。另一类是“技术上”的假阳性, 即由于双杂交技术上的局限而鉴定出的蛋白质与蛋白质间的相互作用。这类假阳性包括筛库过程中自发升高的 BD 融合蛋白自我激活导致的假阳性、AD 融合蛋白与多个 BD 融合蛋白的表达均可激活报告基因转录导致的假阳性、BD 融合蛋白不存在的情况下 AD 融合蛋白单独激活报告基因导致的假阳性以及酵母中其它蛋白质作用引起的假阳性等。有时, 由于在某些酵母菌株中大量表达外源蛋白质, 常会带来毒性作用, 影响菌株生长和报告基因的表达。而在培养中添加 3-AT (3-Aminotriazole) 或 6-Azauracil 可抑制背景表达, 但这些添加物对菌株也有一定毒性, 从而使一些蛋白质间较弱的相互作用可能会因此而被掩盖 (James, 1996)。应该注意的是, 虽然双杂交系统可筛选出发生相互作用的大量蛋白质, 但其中部分蛋白质在生理状态下可能不发生相互作用, 双杂交只是反映蛋白质之间发生作用的可能性, 这种可能性还必须经过其它实验验证, 尤其要与生理功能研究相结合, 否则可能会误入歧途。

## 1.4 水稻白叶枯病菌致病性的分子机理

水稻白叶枯病 (bacterial blight of rice) 是由水稻黄单胞细菌水稻致病变种 (*X. oryzae* pv.

*oryzae*, Xoo) 侵染引起的严重危害水稻生产的细菌性病害之一。近三十年来, 随着许多高氮水稻品种大面积推广应用, 水稻白叶枯病不仅已成为亚洲等水稻主产区的主要病害, 而且在澳大利亚、非洲、拉丁美洲以及北美洲都有该病害的发生 (Ryba *et al.*, 1995; Mew, 1993)。我国每年因此病造成的水稻产量损失在 10% 以上 (方中达, 1990)。水稻白叶枯病是一种维管束病害, 在自然条件下, Xoo 通常由水孔或伤口侵染, 进入木质部, 在其中繁殖, 并向导管移动。一旦进入导管, Xoo 将不断增殖, 直至导管被菌体和胞外多糖、黄原胶堵塞。如果在苗期或者分蘖早期侵染, 将会造成稻苗的萎蔫。如果是在后期侵染, 病斑将会沿着叶脉扩展, 并逐渐变成灰绿色至黄色。水稻发病后, 一般减产 20-30%, 在危害严重的田块, 可以造成 50% 的减产 (Ezuka and Kaku, 2000)。种植抗病品种是生产上控制水稻白叶枯病的主要措施。但因 Xoo 致病性的变异和新毒性群体的出现, 往往使经过数年培育的抗病品种在推广种植几年后就丧失了抗病性 (Leach and White, 1996)。

从经济的角度上考虑, 水稻白叶枯病是水稻上的一种重要病害, 因此在病害诊断、病菌分离、流行病学及病害防治方面都已有大量研究。另外, 根据 *X. oryzae* 和 *X. campestris* 在卵磷脂活性、丙酸钠利用、菌体全蛋白、脂肪酸侧链类型、寄主植物种类、寄生方式和致病表型等方面的差异, 认定 Xoo 是禾本科植物上的模式革兰氏阴性病原细菌 (Ronald and Leung, 2002)。近年来, 通过对 Xoo 致病相关基因的研究, 人们对 Xoo 的致病机理以及与水稻互作分子基础的了解取得了较大进展。代表性的基因群有效应蛋白基因、无毒基因 (avirulence genes, *avr*)、过敏性反应和致病性基因 (hypersensitive response and pathogenicity genes, *hrp*)、与胞外多糖和细胞壁降解酶产生有关的基因等。在植物病原细菌中, 由 *hrp* 基因编码的 III 型蛋白分泌系统 (type III protein secretion system, TTSS) 在非寄主或抗性寄主上激发防卫反应和感病寄主上的致病性中起重要作用 (Lindgren, 1997)。一些 Hrp 蛋白形成菌毛, 推测其功能是形成通道运输效应蛋白如无毒因子进入植物 (Rossier *et al.*, 2000)。除了 TTSS, II 型分泌系统在分泌如胞外酶 (如木聚糖酶) 等其它毒性因子时起作用 (Xu and Gonzalez, 1989; Ray *et al.*, 2000), 与胞外多糖的合成有关的 *gum* 基因簇也是一种毒性决定因子 (Dharmapuri and Sonti 1999)。

病原细菌基因组序列测定是了解致病机制和限定寄主范围机制非常重要的一步。已经测定了几个植物病原细菌的全基因组序列如 *A. tumefaciens* (Wood *et al.*, 2001)、*P. syringae* (Buell *et al.*, 2003)、*R. solanacearum* (Salanoubat *et al.*, 2002)、*X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000)。在 *Xanthomonas* 细菌中, 已经报道了 *X. axonopodis* pv. *citri* (da Silva *et al.*, 2002)、*X. campestris* pv. *campestris* (da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005)、*X. campestris vesicatoria* (Thieme *et al.*, 2005;) 的全基因组序列。从这些基因组序列中已经推测出了与致病性相关的基因, 例如由细菌产生的可以转移的效应蛋白, 以及与其它生物学过程有关的基因。因为水稻与其它黄单胞属病菌的寄主在分类上明显不同 (单子叶植物而非双子叶植物), Xoo 基因组含有一些特异的基因决定了其与水稻的互作。Xoo 菌株 KACC10331 和 MAFF311018 (Lee *et al.*, 2005; Hirokazu *et al.*, 2005) 全基因组序列和结构的公布, 为从基因组水平上了解 Xoo 致病机制提供了非常便利的平台。

#### 1.4.1 Xoo 基因组的总体特征

Xoo KACC10331 基因组是单个环状染色体, 大小为 4,941,439bp。没有自主的质粒。基因组 G+C 含量平均为 63.7%, 比 Xac (64.7%), Xcc (65.0%) 和 *R. solanacearum* (67.0%) 基因组 G+C

含量稍低,但是比其它植物病原细菌如 *X. fastidiosa* (52.6%), *A. tumefaciens* (58–60%) 和 *P. syringae* (58.4%) 的基因组含量高。基因组大部分为编码序列,推测其包含 4637 个编码多肽的 ORFs。根据已知的 COGs (或者序列相似性) 可以对其中的 3340 个 (72.0%) 推测的基因分配功能。剩余的 1297 个基因 (27.9%) 可能表达未知功能的蛋白。复制起始位点由 *dnaA* 盒组成,位于 50S 核蛋白 L34 的编码基因和推测表达 *dnaA*、*dnaN* 和 *recF6* 的 *gyrB* 位点之间。同时鉴定出两组独立的 23S–5S 和 16S rRNA 基因,每组由 2 个操纵子组成。另外还发现了可以识别 54 个密码子的 tRNAs 编码基因 (Lee *et al.*, 2005)。

#### 1.4.2 Xoo 与 Xac 和 Xcc 的全基因组序列比较

Xoo、Xac 和 Xcc 的全基因组序列比较,发现在 Xoo 和 Xac 之间发生了很多重排(反向匹配)。许多重排发生在复制起始位点附近,而 Xoo 和 Xcc 的序列比对,仅发现了一些直向匹配。Xoo 的基因组与 Xac 和 Xcc 的基因组不是共线性的,而是对角线匹配。Xac 和 Xcc 之间的排列比较发现有 3 个主要的重排:一个是在复制终点附近的翻转,另外两个是对称的位于复制起点随转座发生的翻转 (da Silva *et al.*, 2002)。

将整个基因组与已报道的 Xac (AE008923) 和 Xcc (AE008922) 基因组序列进行比较,发现了 Xoo 包含 245 个所特有的基因,它们在 Xac 和 Xcc 中都不存在。其中 95 个基因编码功能性蛋白,150 个是未知功能的 (Lee *et al.*, 2005)。Xoo 中特有基因的功能涉及限制-修饰 (restriction-modification, RM)、TonB 依赖型铁载体受体、毒素产生 (mlrB、Rtx)、TTSS 效应蛋白和噬菌体相关蛋白。而且,在 Xoo 中 *rax* 基因是特异的,与 I 型分泌和激发水稻抗性蛋白 Xa21 所需的硫化作用有关 (da Silva *et al.*, 2004)。

#### 1.4.3 活动组分

在 Xoo 其它菌株中曾经鉴定出 5 个插入序列 (IS; IS1112 = TNX8, IS1113 = TNX1, IS1114, TNX6 和 TNX7) (Zhu *et al.*, 2000; Goel *et al.*, 2002; Rajeshwari and Sonti, 2000; Leach *et al.*, 1990), 在 Xac 和 Xcc 中分别鉴定出 109 和 108 个转座成分。Xoo 基因组中转座成分的数量是 Xac 或 Xcc 基因组的两倍以上。在 478 个 Xoo IS 组分蛋白编码序列中,有 271 个与转座酶基因具有很高的相似性,表明它们在基因的水平转移和基因组的内部重排中起重要的进化作用。Xoo 基因组中有 207 个基因与可移动的遗传组分有关。包括在 IS 内部的转座酶基因、转座子和 37 个明显的原噬菌体相关基因。Xoo IS 组分可以划归 6 个已知的 IS 家族:IS3、IS4、IS5、IS30、ISNCY 和 IS630 (Birkenbihl and Vielmetter, 1989; Matsutani, *et al.*, 1987)。IS5 家族是最丰富的,在 207 个 IS 组分中有 117 个拷贝。在 Xcc 中,IS5 家族数量也很多,IS1478 有 16 个拷贝 (Chen, *et al.*, 1999),然而,在 Xac 中,IS3 家族更多一些,其中一个成员 (ISXac3) 有 21 个拷贝,以前并没有在 *Xanthomonas* 中发现。许多 IS 组分分布在菌株特异的基因附近,使用不同的密码子,G+C 含量也明显不同,表明这些基因可能是通过水平转移获得的。噬菌体也可以导致进化以及毒性因子和其它性状基因的水平转移 (Krylov, 2003),在 Xoo 的菌株中发现了大量的噬菌体 (Ezuka and Kaku, 2000)。在 Xoo 基因组中约 1.7Mb 的片段中,发现一个噬菌体相关的基因簇 (27kb) 编码了尾蛋白、整合酶、

衣壳、裂解酶和复制酶,几乎完整的原噬菌体。这个基因簇与 Xcc 基因组中的 XccP1 噬菌体非常相似,然而 Xoo 缺少编码噬菌体有关的 orf8,它在 Xcc 基因组中编码噬菌体相关的尾部纤维蛋白和 int 与 orf37 间 5 个假设蛋白,因此, Xoo 基因组中原噬菌体基因簇比 Xcc 中少。Xoo 与 Xcc 中成簇的原噬菌体基因存在很高的氨基酸相似性(74–97%)。Xac 多数缺少尾基因,但是 Xac 与 Xoo 噬菌体的剩余部分仍存在很高的氨基酸相似性(77–96%)(Lee *et al.*, 2005)。

#### 1.4.4 代谢特征和 RM 系统

Xoo、Xac 和 Xcc 有多种不同的途径产生中间产物、小分子和 DNA 代谢。在 Xcc 而非 Xac 中,鉴定出具有吸收和转化硝酸盐和亚硝酸盐成为氨基酸的基因(*nasTACDEF* 和 *cysG*)。Xoo 仅含有 *nasT* (3 个拷贝) 和 *nasF* (2 个拷贝),表明 Xoo 和 Xac 都不具备这个功能。在 Xoo 基因组中鉴定出一种 ABC 类型的多肽转移系统(*oppA*、*oppB* 和 *oppC*),可以协助小的多肽进入。表明 Xoo 具有不同于 Xac 和 Xcc 的硝酸盐吸收和多肽运输能力。许多细菌可以通过细胞间的通讯系统感受它们的种群密度,当其种群达到一定阈值时,可以改变特定基因的表达,这种现象称为群体感应(Von Bodman *et al.*, 2003)。植物病原细菌 *A. tumefaciens*、*E. carotovora* 和 *R. solanacearum* 具有与 *Vibrio fischeri* 中 LuxR/LuxI 相似的群体感应机制,利用酰基-高丝氨酸内酯(*acyl-homoserine lactones*, AHLs) 调节一些毒性基因。尽管 AHLs 介导的群体感应在体外研究的已经很透彻,但是信号感应和调节的动态规律在本质上很难定义,而且目前正不断出现新层次上的复杂性。例如,不同的细菌产生不同的 AHLs,同一种菌也可能产生不止一种 AHLs。已知 AHLs 分子的酰基链的长度可以不同(4–18 碳),可以包含双链,或者在 C3 位置上被羰基或羟基代替(Fuqua and Eberhard, 1999; Whitehead *et al.*, 2001)。另外,群体感应调节可能是菌株特异的,不同的菌株产生不同的 AHLs,或者根本检测不到 AHLs(Cha *et al.*, 1988; Elasmri *et al.*, 2001)。在 Xoo 基因组中,发现了乙酰化作用、O-乙酰基转移和高丝氨酸脱氢作用的基因,但是与 LuxR/LuxI 具有序列相似性的基因并不明显。

在 Xoo 中已报道过 2 个 DNA RM 系统影响转座子突变和转化的效率(Choi and Leach, 1994; Choi *et al.*, 1998)。在 Xoo 基因组中鉴定出 2 个 II 型 RM 系统,分别是 XorI 和 XorII。另外,还存在 3 个 I 型 DNA RM 系统。

#### 1.4.5 致病相关基因

植物与病原物互作的结果决定于各自所带的基因。在多数情况下,寄主编码的抗病基因(R)产物识别由病菌编码的无毒基因(*avr*)产物,这种互动触发一个快速的防卫反应,即非亲和反应,病原细菌被限制在初始侵染位点。病菌 *avr* 基因只有在 *hrp* 基因参与时才能诱发植物产生非亲和反应。当病菌中缺少合适的 *avr* 基因或者寄主植物中缺少 R 基因,都将会导致亲和性互动,这种情况下,病菌通过向植物分泌胞外酶、胞外多糖及其它致病因子,克服植物固有的防卫机制,使植物发病。

现已确定了大约 30 个水稻抗白叶枯病基因,其中 5 个(*Xa1*、*Xa5*、*Xa21*、*Xa26* 和 *Xa27*)已经克隆(Iyer and McCouch, 2004; Gu *et al.*, 2005)。*Xa1* 是一个受病菌诱导的存在于胞内的典

型的抗病基因,其编码的蛋白在序列上包含一个核苷酸结合序列(nucleotide-binding sequence, NBS)和富含亮氨酸重复区(LRR),能引起水稻对Xoo日本1号小种的抗性(Yoshimura *et al.*, 1998)。Xa21是一个组成型表达的基因,编码蛋白具有一个位于胞外的LRR区及位于胞质的激酶区,能引起水稻对Xoo菲律宾小种6的抗性(Song *et al.*, 1995)。Xa27是一个没有内含子的基因,编码113个氨基酸。除了水稻,在其它生物中没有发现与Xa27具有序列相似性的蛋白(Gu *et al.*, 2005)。目前为止,仅有Xa27相应的无毒基因avrXa27已从Xoo中分离,而其它R基因相对应的avr基因还没有确定。由于各个R基因的结构存在较大差异,相对应的avr基因间的差异可能也比较大。

#### 1.4.5.1 avr 基因

在已报道的Xoo KACC10331基因组中鉴定出了8个已知的avr基因的同源序列。其中有4个avrBs3/pthA无毒基因家族的序列,avrBs3和avrBs2各一个。还有两个popC同源序列,popC最初是从*R. solanacearum*中鉴定的avr类似的效应子基因。这些基因与Xac中的相应序列具有的同源性较Xcc中高(Lee *et al.*, 2005)。

avrXa5、avrXa7、avrXa10和avrXa27都属于黄单胞菌中最早克隆的无毒基因avrBs3家族(Bonas *et al.*, 1989; Gu *et al.*, 2005)。此家族基因最大的特点是其编码的蛋白中部有一个由34个氨基酸组成的重复单元,重复的次数在不同的基因中不同,但每个重复单元的氨基酸除第12和13位外,其它位点都是很保守的,12和13位的氨基酸组成重复区中的可变区,可变区的排列可能决定了携带不同无毒基因的小种特异性。研究较为清楚的AvrXa7、AvrXa10和AvrXa27分别包括25.5、15.5和16.5个重复区。把AvrXa10的重复区代换为AvrXa7和AvrBs3的重复区,其小种特异性发生改变。AvrXa7重复区与AvrXa10组成的嵌合蛋白失去了与抗病基因Xa10特异性互作的特性,而具有与Xa7特异性互作的特性。AvrBs3重复区与AvrXa10组成的嵌合蛋白赋予Xoo在其非寄主植物-辣椒上产生过敏性反应,这个嵌合的无毒蛋白在含抗病基因Bs3的辣椒上产生无毒症状(Leach and White, 1996)。

AvrXa7、AvrXa10和AvrXa27与其它AvrBs3家族的成员相似,在其C端包含一个结构上与许多真核生物的转录调节因子相似的酸性激活区和三个核定位信号(NLS)序列。切去C端包含酸性激活区的38个氨基酸或代换C端的3个疏水性氨基酸残基,病菌在水稻上的无毒活性及其在酵母杂交分析中的转录活性丧失,疱疹病毒蛋白VP16的活性区能恢复丧失的无毒活性及转录活性,表明转录激活区对发挥AvrXa7和AvrXa10的功能是必须的(Zhu *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999)。实验表明AvrXa7蛋白倾向于结合富含A/T的双链DNA,而且在三个NLS区的突变也影响其无毒活性功能及在酵母细胞中的定位,这种影响可被SV40的T抗原NLS区恢复(Yang *et al.*, 2000)。这些结果表明,AvrXa7和AvrXa10的识别发生在寄主细胞核内,需转录激活区的参与。*X. campestris* pv. *vesicatoria*中的avrBs2在*X. campestris*菌株中高度保守,在Xoo基因组中也有过报道(Mazzola, *et al.*, 1994)。AvrBs2是一个TTSS转运效应子,在感病寄主中作为毒性因子,但在抗性寄主中能激发防卫反应(Swords *et al.*, 1996; Mudgett *et al.*, 2000)。Xoo中avrBs2同源基因与合成和水解磷酸二酯键的酶具有相似的区域。具有avrBs2突变的*X. campestris*菌株克服了抗性基因Bs2的抗性,表明这个酶活性对于无毒功能来说非常重要(Mudgett *et al.*, 2000)。

近年来对 AvrXa21 活性的分子机制进行了许多研究,在对 Xoo PR6 的 Tn5 转座子插入突变体库筛选时发现其中有两个基因(*raxP* 和 *raxQ*),对 AvrXa21 的表达是必须的(Shen *et al.*, 2002)。*raxP* 和 *raxQ* 位于硫同化作用相关的一个基因簇上,编码 ATP 硫酸化酶及腺苷酸-5'-磷酸硫酸(APS)激酶,这两种蛋白共同作用产生两种活性硫酸盐、APS 及 3'-磷酸腺苷酸-5'-磷酸硫酸(PAPS),其中任何一个基因的破坏,将使 APS 和 PAPS 不能产生,在含有 *Xa21* 抗病基因的水稻上表现致病,表明硫酸化作用在 AvrXa21 活性中起重要作用。然而,尚不清楚硫酸化作用是否存在于 AvrXa21 效应子或在 AvrXa21 的合成中起调节作用,AvrXa21 效应子也尚未鉴定出来。因为硫酸化分子在许多生物中作为配体或受体,AvrXa21 效应因子无论是碳水化合物还是蛋白,可能经过硫酸化后,再与 Xa21 的胞外结构域特异地互作。

许多无毒基因(如 *avrBs2*、*pthA*、*avrA*、*avrE*、*avrBm*、*avrRPM1* 及 *avrPto*)除了与抗病基因特异性互作产生抗病反应外,还在病菌侵袭力及其病害症状表现上起一定作用(White *et al.*, 2000)。实验表明,*avrXa7* 和 *avrXa5* 及其四个同源基因 *aB3.5*、*aB3.6*、*aB4.3*、*aB4.5* 的插入突变体在不含抗性基因的水稻品种 IR24 上的症状减轻。然而,这种双重作用在 *avrXa10* 上尚未发现(Bai *et al.*, 2000)。这些结果有利于解释为什么无毒基因在病菌体内以多个拷贝形式保存下来,新的抗病品种的使用使含有特定无毒基因的小种得以发展,病原细菌会选择一些新的基因家族来避免被抗性基因识别而且能保留其侵袭力。实验还表明,AvrXa7 的转录激活区和 NLS 区对发挥其毒性功能也是必需的,说明这些无毒基因的毒性功能是通过进入寄主细胞核而直接影响寄主基因转录的(Yang *et al.*, 2000)。

由于细菌中无毒基因的功能丧失使细菌相应的小种能侵染单个抗性基因的寄主,然而,与无毒基因功能丧失相关的病菌寄生度的不同限制了病害的流行程度,这在只包含单个抗性基因(*Xa7*、*Xa10*、*Xa4*)的近等基因系(NILs)的水稻上得到了证实。田间实验发现,含有 *Xa10* 和 *Xa4* 的 NILs 水稻的白叶枯病严重度比含有 *Xa7* NIL 的水稻要高得多,只有少数几个 Xoo 小种能侵染含有 *Xa7* NIL 的水稻,而且这些小种的侵袭力也减低。进一步的实验表明,AvrXa7 无毒活性的丧失及病菌侵袭力的减低与 *avrXa7* 基因 3'端的突变有关。这些结果表明由于 *avrXa7* 变异后病菌定殖能力下降,与 *Xa4* 和 *Xa10* 相比,*Xa7* 引起的抗病性更持久(Cruz *et al.*, 2000)。*Xa27* 和 *avrXa27* 是从水稻上确定的第一个细菌 *avr* 基因和 R 基因的组合。*Xa27* 抗病和感病的等位基因编码相同的蛋白,但是,当水稻接种带有 *avrXa27* 的细菌时,只有抗性的等位基因表达。*avrXa27* 的产物是一个核定位的 III 型效应因子。而 *Xa27* 只在被侵染组织的附近被诱导表达。*Xa27* 的表达导致水稻对其它亲合菌也产生抗性。因此,*Xa27* 对于非亲合菌的专化性在 AvrXa27 存在时也涉及 R 基因差异表达。AvrXa27 和其它相关的 III 型效应蛋白都具有转录激活蛋白的相似特征,无论作为激发子还是毒性因子都可能发挥转录因子的作用。AvrXa27 的存在诱导 *Xa27* 的表达,与上述模型相符(Gu *et al.*, 2005)。然而,AvrXa27 是通过直接作用于 *Xa27* 的启动子还是通过激活内源转录因子间接起作用还不得而知。

Xoo、Xac 和 Xcc 三个基因组中均包含 PopC-like LRR 蛋白。LRR 基元在蛋白质-蛋白质互作中非常普遍(Young, 2000; Gueneron *et al.*, 2000)。Xoo PopC 由 667 个氨基酸组成,携带 10 个 LRRs。其它一些植物和动物致病细菌编码 YopJ 同源物,是其毒性所需的半胱氨酸蛋白酶(Lahaye and Bonas, 2001),与 Xac 相似,Xoo 缺少 YopJ 同源物。

#### 1.4.5.2 *hrp* 基因

许多革兰氏阴性动、植物病原细菌与寄主的互作依赖于保守的 III 型分泌系统 (type III protein secretion system, TTSS)。在植物病原细菌中, TTSS 由 *hrp* 基因编码, 在非寄主或抗性寄主上激发 HR 反应, 在感病寄主上引起致病反应。*hrp* 基因首先在大豆斑点病菌 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) 中发现 (Lindgren *et al.*, 1986), 以后在许多病原细菌, 包括 *Erwinia*、*Pseudomonas*、*Ralstonia* 和 *Xanthomonas* 中相继被发现。至少有 9 个 *hrp* 基因在动、植物病原细菌中是保守的 (*hrp* conserved, *hrc*), 它们可能编码 TTSS 的核心组分。而 *hrp* 基因簇中其它基因编码的蛋白, 对于分泌和运输都是必需的。有些非保守的蛋白是分泌蛋白, 如 Hrp 菌毛的亚基。在体外, Hrp 菌毛是 III 型分泌途径不可缺少的, 可能作为运输细菌蛋白进入植物细胞的通道, 如毒性因子和无毒因子。

*X. campestris* pv. *vesicatoria* 的 *hrp* 基因簇是 *Xanthomonas* 中研究最详细的, 大小约为 23kb, 包含从 *hrpA* 到 *hrpF* 6 个操纵子 (Bonas, *et al.*, 1991)。其中 HrpF 可能是 III 型转位子蛋白, 是致病性必需的 (Buttner *et al.*, 2002)。这 6 个操纵子在植物中诱导表达, 并受调节基因 *hrpX* 和 *hrpG* 产物的调控。HrpG 属于 OmpR 双组分调控蛋白家族, 可以激活 *hrpA* 和 *hrpX* 的表达。HrpX 编码的蛋白属于 AraC 正调控转录激活子家族。它控制从 *hrpB* 到 *hrpF* 操纵子以及 *avrXv3* 和一些毒性因子的表达 (Wengelnik and Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1999)。

分析不同细菌中的 III 型分泌系统可为其致病性研究提供新的思路。*hrpX* 的同源基因 *hrpXo*, 是从 Xoo 中克隆的第一个 *hrp* 基因, *hrpX* 基因的突变导致在水稻上丧失致病性及在曼陀罗 (*Datura stramonium*) 和萝卜等非寄主植物上不能引起 HR 反应。来自 Xcc 的 *hrpXc* 能互补突变体的功能, 恢复激发 HR 反应的能力。反过来, *hrpXo* 也能互补 *X. campestris* pv. *campestris* 和 *X. campestris* pv. *armoracia* 中相应基因突变而丧失的致病性。这些结果表明, *hrpXo* 和 *hrpXc* 具有功能上的一致性 (Kamdar *et al.*, 1993)。以辣椒斑点病菌 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) *hrp* 基因簇的部分序列为探针, 已分离到一个 12.2 Kb 的片段, 此片段包含 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 中 *hrpA*、*hrpB*、*hrpC* 和 *hrpD* 的相应片段 (Zhu *et al.*, 2000)。Tn5 转座子在此片段的插入导致在水稻上丧失致病性及在非寄主植物番茄上不能引起 HR 反应, 而野生型 Xoo 的 *hrp* 基因能部分互补这种功能, 表明 TTSS 对 Xoo 的致病性及引起 HR 反应是必须的 (Zhu *et al.*, 2000)。在这个 12.2 K 的克隆中进一步发现两个位于 *hrp* 基因簇上游的基因 *hpa1* 和 *hpa2* (Zhu *et al.*, 2000)。*hpa1* 和 *hpa2* 的缺失使致病性减弱, 在非寄主和抗性植物诱发微弱的 HR 反应。单点突变分析表明 *hpa1* 功能的丧失是致病性降低的主要原因。*hpa1* 的基因产物与来自 *P. syringae*、*Erwinia* 及 *R. solanacearum* 的 Harpin 蛋白相似 (Wei *et al.*, 1992; He *et al.*, 1993; Arlat *et al.*, 1994; Gaudriault *et al.*, 1998)。Harpin 蛋白为氨基乙酸含量较高、通过 TTSS 分泌的一类蛋白。一些 Harpin 蛋白, 如 *hrpW*、*popA*、*hrpZ* 和 *hrpN* 的基因产物, 可以引起 HR。而 HrpN 对致病性来说也是必需的。在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 中, 发现了 *hpa1* 的同源基因 *xopA*, 该基因产物是通过依赖 *hrp* 的 TTSS 分泌, 而且对于在植物中生长和完全的致病性也是必不可少的 (Noel *et al.*, 2002)。这些结果表明, Xoo 中的 Hap1 也可能是通过 *hrp* 的 TTSS 分泌。

对病原细菌中无毒蛋白的研究表明, 由 *hrp* 基因编码的 III 型分泌系统可能负责将无毒蛋白转运到寄主植物细胞内, 如 AvrBs3 在特定的培养基上通过 TTSS 分泌 (Rossier *et al.*, 1999)。在



辣椒细胞中表达 *avrBs3* 可以引起 R 基因特异的 HR。Xoo 中通过 TTSS 将 *avr* 基因产物运输至水稻细胞的证据还比较有限。与 *AvrBs3* 相似, 从 *E. coli* 或 Xoo 中提纯的 *AvrXa10*, 直接注射到含 *Xa10* 抗性基因的水稻叶片中, 并不能诱导其产生 HR 反应 (Young *et al.*, 1994)。这些结果并不能作为 Xoo 的无毒基因产物通过 TTSS 运输的直接证据。然而, 因为 *AvrXa5*、*AvrXa7* 和 *AvrXa10* 蛋白都属于 *AvrBs3* 家族, 所以 Xoo 的无毒基因产物也可能是通过 TTSS 转运到水稻细胞中。

Xoo 全基因组序列测定以后, 在其中发现了一个 *hrp* 基因簇, 包括 *hpa2* 和 *hrpF* 在内的 26 个基因。Xoo 的 *hrp* PAIs (31.3 kb) 比 Xac (25.6 kb) 和 Xcc (23.1 kb) 中的相应部分大, 这是由于在 *hpaB* 和 *hrpF* 基因之间存在 4 个转座酶基因 (大约 6kb), 除此之外这些基因簇非常相似 (Lee *et al.*, 2005)。在 Xoo 和 Xac 的一些同源 *hrp* 基因之间存在很高的氨基酸同源性: *hpaF* (74%)、*hpaP* (76%)、*hrpD5* (79%)、*hpaA* (82%)。而另外一些基因同源性偏低: *hrpF* (68%)、*hpa1* (65%)、*hrpB5* (66%) 和 *hrpB7* (65%)。非常有趣的是, *hrpF* 和 *hpa1* 基因产物是 III 型分泌系统的泌出组分, 这一特点可以解释它们在不同寄主的选择压力下的多样性。在 Xoo 基因组中, *hrpW* 基因的同源序列不明显, *hrpW* 推测编码的是果胶裂解酶, 但是在 Xoo 中存在一些其它的果胶裂解酶基因。其中的一个根据序列相似性命名为 *hrpW*。其它病原细菌中的 *hrpW* 具有激发 HR 的活性, 但并不具有果胶裂解酶活性 (He, 1998)。E. *amylovora* 也有 *hrpW*, 而且在 E. *amylovora* 中过量表达 *hrpW* 可以互补 *hrpN* 突变, *hrpN* 突变大大降低了 HR 产生能力和致病性, 表明 *hrpN* 和 *hrpW* 在功能上是冗余的 (He, 1998)。在 Xoo、Xac 和 Xcc 基因组中, *hrpX* 和 *hrpG* 同源序列在相似的位置出现。在其它 *Xanthomonas* 菌株中, 受 *hrpX* 调节的基因在启动子中往往存在 PIP 盒 (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) (Fenselau and Bonas, 1995)。在 Xoo 基因组中, 发现了 14 个拷贝的类似序列 (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCGn)。有 4 个 PIP 盒在 *hrp* 基因簇的启动子区。另一个与 *avr* 基因的启动子有关, 还有一个与 PopC 类似的富含亮氨酸的蛋白有关。剩余的 8 个分散在基因组中, 分别与肽酶、依赖于 TonB 受体蛋白、核糖核苷双磷酸还原酶和三个推测的蛋白有关 (Lee *et al.*, 2005)。

*hrp* 基因的表达受到严格的调节, 这些基因只在植物中或者模拟植物的条件下表达, 而在营养丰富的培养基上是不表达的 (Marenda *et al.*, 1998; Schulte and Bonas, 1992; Wengelnik *et al.*, 1996)。建立一个在培养基上诱导 *hrp* 基因表达的系统, 对于分析 *hrp* 基因产物的功能、确定通过 TTSS 分泌的物质以及它们在致病性和引发 HR 反应中的作用是非常重要的。一些细菌在 *hrp* 基因诱导培养基上培养时, 可以通过依赖 *hrp* 基因的方式分泌致病相关蛋白, 并通过电子显微镜观察到了 *hrp* 菌毛的形成和通过菌毛分泌致病相关因子。在 *Xanthomonads* 中, 对于 X. *campestris* pv. *vesicatoria* 也有了 *hrp* 基因诱导培养基 XVM2 (Schulte and Bonas, 1992; Wengelnik *et al.*, 1996), 在此基础上发展出来 Xoo 的 *hrp* 基因诱导培养基 XOM1 和 XOM2 (Tsuge *et al.*, 2002), 为研究依赖 *hrp* 基因的分泌蛋白和 *hrp* 基因的表达机制提供了有利的条件。

#### 1.4.5.3 胞外多糖, 脂多糖和表面特征

Xoo 的一个与其它 *Xanthomonas* 菌相似的特征是在含有葡萄糖的培养基上形成黏着的菌落。这种表型是由于大量胞外多糖 (又被称为黄原胶) 引起的, 它是 *gum* 操纵子产物。EPS 是重复的五聚体, 由 2 个葡萄糖、2 个甘露糖和 1 个葡萄糖醛酸组成, 往往还包含一些修饰, 如乙酰化作用。在 Xoo 长期保存及继代培养过程中会发生自发性的细菌毒性降低及 EPS 合成减少 (Rajeshwari and

Sonti, 2000)。因此, EPS 被认为是毒性因子。在 Xoo 基因组中, 发现了一个 *gum* 操纵子 (16kb), 由 13 个基因组成, *gumBCDEFGHIJKLMN*, 与 Xcc 中的 *gum* 操纵子相比较, 除了 *gumN*, 二者基本相似。在 Xoo 中, *gumG* 同源序列的转座子插入突变, 会导致 EPS 的减少和水稻上毒性的丧失。Xoo 中 *gumG* 突变的恢复, 将会重新产生 EPS 和毒性。Xoo 的 *gumM* 对 EPS 的合成也是必需的, *gumM* 的突变使 EPS 不能合成, 毒性丧失 (Rajeshwari and Sonti, 2000)。另外, 实验表明, 通过 Tn5 转座子突变, 在 Xoo 中发现一个新的位于 *gum* 基因簇外的基因位点对 EPS 合成和毒性也是必需的。其中有两个转座子插入位点位于糖核苷异构酶和糖基转移酶基因上, 这个区域基因具有一个明显特点, 其 G+C 含量 (51.7%) 明显低于整个细菌基因组的 G+C 含量 (约 65%), 可能是通过基因水平转移获得的。此基因座在其它黄单胞菌中尚未发现 (Dharmapuri *et al.*, 2001)。EPS 在毒性上的作用可能表现在以下方面: 首先, EPS 中含有大量水份, 在细菌入侵到充满空气的植物细胞间隙生长时提供水份, 防止干燥及疏水抑菌物质的破坏作用; 其次, EPS 的粘附性有利于病菌粘附到植物细胞表面; 另外, 部分纯化的 EPS 提取物能诱导水稻叶片的萎焉, 这可能是由 EPS 引起细胞膜的渗漏 (Kuo *et al.*, 1970; Vidhyasekaran *et al.*, 1989)。在 Xoo 中, EPS 的合成受双组分系统 *rpfC* (Regulation of Pathogenicity Factor) 基因的调控。*rpfC* 基因的突变使 EPS 合成量及毒性大大减低, 但病菌在寄主水稻体内的增殖不受影响 (Tang *et al.*, 1996a)。以上研究结果表明, EPS 是 Xoo 中重要的致病因子。

在 Xoo 基因组中, 三个不同的基因 *wxD* (O-抗原酰基化酶)、*oma* (外膜抗原) 和 *rbfC* (O-抗原生物合成中起作用) 分布在三个不同的区域。然而, 在 Xcc 基因组中, O-抗原合成的基因组成一个簇 (Vorhölter *et al.*, 2001)。第一个区域包含编码转移酶、表异构酶、转座酶和糖转移蛋白的基因, 第二个区域包含 *xanAB* 和 *rmlDABC* 基因, 它们与核苷-糖和 dTDP-L-鼠李糖生物合成有关 (Koplin *et al.*, 1993)。Xoo 的 O-抗原与 Xcc 和 Xac 基因组中相应的部分缺乏明显的相似性。这些结果与 LPS O-抗原是致病变种特异推断相同。对 LPS 的兴趣源于它们与寄主防卫反应的复杂相互作用和在病原细菌毒性方面的作用。O-抗原形成亲水性表面, 在决定寄主范围和致病性中起作用, 可以作为抵抗植物毒素的屏障 (Dow *et al.*, 1995; Whitfield, 1995)。

黄单胞菌色素是黄单胞菌属细菌产生的一种膜结合色素。目前还不清楚其是否与细菌的致病性有关。对 Xcc 的白色或色素产生量减少的突变体研究表明, 色素在细菌致病过程中不起决定性的作用。然而, 一个黄单胞菌色素合成缺陷的 Xoo 突变体在水稻上表现为致病性丧失及芳香族氨基酸的营养缺陷型 (Aro)。遗传学分析表明, Xoo 中负责黄单胞菌色素合成的莽草酸脱氢酶基因能互补 *E. coli* 的 *aroE* 突变体。在野生型菌株中能检测到莽草酸脱氢酶的活性而突变体则检测不到 (Goel *et al.*, 2001)。

Xoo 基因组也包含 IV 型鞭毛和一些富含甘氨酸的外膜蛋白基因, 这些蛋白与病原细菌在寄主上定殖和附着有关 (Cao *et al.*, 2001)。例如, *xadA* 编码一种与毒性有关的外膜蛋白, 与其它 *hrpG* 编码的致病因子共调节 (Noel *et al.*, 2001)。在 Xoo 的基因组中鉴定出 *xadA* 的两个等位基因, 这与 Xac 基因组相同, 在 Xcc 基因组中仅有 1 个等位基因。

#### 1.4.5.4 潜在的致病性和毒性因子

RTX (repeats in the structural toxin) 毒素是多种人类和动物病原细菌重要的毒性因子 (Welch

*et al.*, 1992), 也存在于一些植物细菌包括 *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000)、*Rhizobium leguminosarum* (Oresnik *et al.*, 1999) 和 *E. carotovora* (Kuhnert *et al.*, 1997) 中。在 Xoo 的基因组中找到 2 个 RTX 毒素的基因 (*rtxA* 和 *rtxC*), 但是这些基因在 Xcc 和 Xac 中不存在。已报道过 Xoo 产生其它毒素, 包括苯乙酸 (phenylacetic acid, PAA)、反-3-甲硫基-丙烯酸 (trans-3-methylthio-acrylic acid, MTAA) 和 3-甲硫基-丙酸 (3-methylthio-propionic acid), 可以引起萎蔫和褪绿 (Noda *et al.*, 1989)。因此, Xoo 基因组中的 RTX 毒素基因也可能是毒性因子。

鞭毛 (Flagella) 是动、植物病原细菌重要的毒性因子 (Moens and Vanderleyden, 1996)。例如, 在 *A. tumefaciens* 中发现失去鞭毛的突变体在向日葵上的致病性减弱 (Chesnokova *et al.*, 1997)。Xoo 具极生单鞭毛, 在一定营养条件下诱导产生 (Shen *et al.*, 2001)。研究发现, Xoo 可以向人工培养基或感病水稻的分泌物移动, 但抗病水稻的分泌物则没有趋化性 (Feng and Guo, 1975)。这表明在进入植物叶片组织前, 鞭毛的运动可能有助于 Xoo 到达侵染位点。一旦进入植物细胞内, 鞭毛就不再起毒性作用。在 *X. campestris* 中, 细菌在游动培养基平板上从非游动态的野生型向游动型的转变, 伴随着黄原胶的产生减少及毒性丧失。已经观察到在受侵染的甘蓝叶片木质部, Xcc 无鞭毛也不能运动 (Kamoun and Kado, 1990)。从 Xoo 中已分离到包含四个 ORF 的鞭毛蛋白合成基因簇。其中一个 ORF 为 *flhF*, 编码 GTP 结合蛋白, *flhF* 的突变使其运动性减弱, 然而, 剪叶接种该突变体表明, 在水稻叶片上并不表现致病性的降低, 说明一旦细菌进入水稻叶片后, 运动性对细菌毒性并无影响 (Shen *et al.*, 2001)。Xoo 鞭毛结构基因缺失突变体的接种试验还需要完成, 以证明运动性在 Xoo 毒性中的作用。研究表明, 耶尔森氏鼠疫杆菌属 (*Yersinia*) 中一些细菌的鞭毛也可以作为分泌系统, 分泌与毒性相关的磷脂酶 (Young *et al.*, 1999)。植物病原细菌中的鞭毛是否在毒性因子的分泌过程中起重要作用还未可知。像 Xac 和 Xcc 一样, Xoo 的基因组序列包括用于鞭毛生物合成和趋化性的基因。与 Xac 和 Xcc 不同的是, Xoo 的趋化性受体和鞭毛生物合成基因组成 2 簇, 分布 62kb, 且只有 2 个甲基化-接受趋化性蛋白基因 (*mcp*) 存在。

许多植物病原细菌分泌多种植物细胞壁降解酶类, 例如纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶和蛋白酶。一般分泌途径 (GSP), 即 II 型分泌系统, 分泌这些胞外酶, 对许多病原细菌在其寄主植物上的毒性是必需的。虽然对于 *X. campestris* 的纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、脂酶和淀粉酶等胞外酶作了大量研究, 然而, 各种胞外酶在致病过程中的作用并不完全清楚, 在不同条件下, 得出的结论并不完全一致 (Chan and Goodwin, 1999)。纤维素酶、蛋白酶和果胶裂解酶对 *Xanthomonas* 菌来说, 在毒性和细菌营养中起重要作用。Xoo 的基因组中有产生多种胞外酶的基因, 包括 7 种纤维素酶, 6 种不同的蛋白酶, 一种多聚半乳糖醛酸酶和果胶降解酶 (1 个果胶脂酶, 2 个果胶裂解酶), 4 个木聚糖酶, 6 个木糖苷酶和 1 个 1, 4- $\beta$ -纤维二糖酶 (Lee *et al.*, 2005)。有研究认为 Xoo 的一种蛋白酶缺陷型突变体在植物上的致病性减弱, 细菌增殖减少 (Xu *et al.*, 1989)。除此之外, 胞外酶在 Xoo 致病过程中的作用知之甚少, 但胞外酶一直被认为是潜在的致病因子。与 Xcc 和 Xac 相比, Xoo 有更多的基因参与果胶的降解, 如纤维素酶和木聚糖酶。研究表明, 木聚糖酶和蛋白酶与 Xoo 的致病性有关 (Xu and Gonzalez, 1989; Ray *et al.*, 2000)。这是符合逻辑的, 因为水稻白叶枯病是一种维管束病害, Xoo 在导管中繁殖和扩展, 其中木聚糖非常丰富。因此, 木聚糖酶降解木聚糖, 为 Xoo 提供能量。在 Xcc 和 Xac 基因组中还没有鉴定出木聚糖酶基因, 表明木聚糖酶的产生可以作为 Xoo 致病性的特征因子。

上述胞外酶的分泌通常涉及到 *xps* 基因簇编码的 GSP 分泌系统 (Dums *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992)。在 *Xoo* 基因组中鉴定出了 *Xps* 系统 (*xpsEFGHIJKLMN* 和 *xpsD*) 的同源序列, 与其它 *Xanthomonas* 菌株中的相应基因的氨基酸相似性大于 79%。尽管胞外酶在致病过程中的确切作用还不十分清楚, 但其分泌系统 (II 型分泌系统) 对细菌致病性是必需的。II 型分泌系统基因的突变使 *X. campestris* 的致病性丧失, 胞外酶在细胞周质中积累。在 *Xoo* 中, II 型分泌系统基因的突变体不能在水稻上致病和泌出木聚糖酶 (Ray *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2005)。

细胞壁降解酶和胞外多糖的合成受 *rpf* (regulation of pathogenicity factor) 基因产物的转录调节。这是一个复杂的调控系统, 涉及到一个小的可扩散分子 (diffusible signal factor, DSF) (Barber *et al.*, 1997)。例如, 在 *Xcc* 中, 当 *rpfE* 基因失活, 蛋白酶和葡聚糖酶的表达水平也降低 (Dow *et al.*, 2000)。在 *Xoo* 中, *rpfC* 基因影响 EPS 的产生和在水稻上的毒性 (Tang *et al.*, 1996a)。在 *Xoo* 基因组中发现了一个 *rpf* 基因簇, 比较 *Xac* 和 *Xcc* 基因组中的相应部分, 该簇具有独特的结构 (*rpfABFCGDIE*)。在 *Xoo* 缺少 *rpfH*, 它与 *rpfC* 的跨膜感受结构域同源, 在 *X. campestris* 中可能起到在细胞膜上固定 *rpfC* 的作用 (Slater *et al.*, 2000)。在 *Xoo* 基因组中, 鉴定出 4 个拷贝的 *rpfI* 基因, 该基因与胞外酶和 EPS 的合成调节有关。在 *Xcc* 中, *rpfI* (orf4) 的转座子插入并不影响多聚半乳糖裂解酶的产生, 但是导致蛋白酶和葡聚糖酶的降低, 胞外酶水平的这些变化并不影响 *Xcc* 致病性 (Dow *et al.*, 2000)。

总之, 水稻是我国的主要粮食作物, *Xoo* 是水稻上一种重要的病原细菌, 也是模式植物病原细菌之一。许多研究对该菌的致病机制进行了探索, 已分离和鉴定出了大量与致病性有关的基因。这些基因包括 EPS 产生有关的基因, 毒性和无毒因子的合成及调控基因, 以及编码胞外酶、毒性因子和无毒因子的分泌系统组分的基因。*Xoo* 全基因组的测序完成成为鉴定毒性相关基因和该致病变种特有基因提供了便利条件。然而, *Xoo* 的致病机制非常复杂, 许多毒性和无毒机制目前仍不得而知。目前需要利用基因组学的方法, 鉴定出其它的致病相关基因, 并确定它们的功能, 为更加全面的了解 *Xoo* 的致病机制提供有用的信息。

## 1.5 GacS/GacA 双组分调控系统及其调控机理

感应蛋白激酶 (sensor kinase) GacS (global activator sensor kinase) 和反应调控蛋白 (response regulator) GacA (global antibiotic and cyanide control) 组成双组分调控系统 (two-component regulatory system), 在许多中细菌中都有发现, 包括 *Pseudomonas*、*Vibrio fischeri*、*Salmonella*、*Legionella* 和 *Erwinia* (Anja *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2003; Christophe and Dieter, 2007; Chieda *et al.*, 2005; Reimmann *et al.*, 2005; Heeb and Hass, 2001; Whistler *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 2006), 该系统控制着一系列表型变化, 涉及到胞外蛋白酶和次级代谢物的产生, 这些蛋白酶和次级代谢物是细菌毒性或与植物共生所必需的, 能保护宿主免受致病真菌的侵害。GacA/GacS 系统还控制着抗菌素、Quorum-Sensing (QS) 信号、毒素、EPS, 以及细菌的移动性、生物被膜 (biofilm) 的形成和蛋白的泌出, 在肠细菌 (*Enterobacteria*) 和荧光假单胞杆菌 (*P. fluorescens*) 中已得到深入的研究。生防细菌抗生素的产生一直被认为是荧光假单胞杆菌最重要的生防机理之一, GacS/GacA 系统调控生防细菌次生代谢物和胞外酶的产生, 在荧光假单胞杆菌的生防活性中起着关键性的调控作用 (Anja *et al.*, 2005)。

### 1.5.1 GacS/GacA 双组分调控系统的定义

信号感应蛋白 GacS, 最早命名为 *LemA* (lesion manifestation), 是作为 *P. syringae* pv. *syringae* 菌株 B728a 豌豆叶片上形成病斑的必需因子提出的。*gacS* 基因的失活突变体使这一菌株失去毒性和生态适应性 (Hirano *et al.*, 2000)。反应调控蛋白 GacA 最早是由生防菌 *P. fluorescens* CHA0 的研究中提出的 (Laville *et al.*, 1992)。在这一菌株中, GacA 作为抗生素和氰化物产生的全局调控因子, 是抗真菌活性和生态适应性所必需的因子 (Laville *et al.*, 1992; Natsch *et al.*, 1994), 其具有整体水平上调节细菌次生代谢物的功能。*P. syringae* pv. *syringae* 的遗传学最早证实了 GacS 和 GacA 是双组分调控系统的两个组成部分 (Rich, 1994), 随后又在其它几种细菌上得到证实 (Aarons *et al.*, 2000; Altier *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2001)。

### 1.5.2 GacS/GacA 双组分调控系统的结构特征

GacS 是定位于细菌细胞膜的信号感应蛋白, 它含有自身磷酸化 (autophosphorylation) 功能域、接收 (receiver) 功能域、输出 (output) 功能域和 GacS 的周质环 (periplasmic loop) 功能域。其中 GacS 的周质环功能域在不同的细菌中保守性很差, 这可能与这一功能域感应不同的信号有关 (Perraud *et al.*, 2000)。在其它感应蛋白中也具有相似的结构, 例如, *E. coli* 中的 ArcB 蛋白, 其能感应氧化还原电位 (redox potential) 氧张力 (oxygen tension) 的变化 (Pernestig *et al.*, 2001); *Bordetella pertussis* 中控制毒性的 BvgS 蛋白也具有 GacS 相似的结构 (Perraud *et al.*, 2000)。GacS 的 N 端是感应功能区, 它由两个跨膜成分组成 (图 1, 阴影方框), 被周质环分开, 这种周质环是许多双组分调控系统蛋白激酶的共同特征 (Stock *et al.*, 2000)。在第二个跨膜功能域相邻的位置, 连接功能域上有两个亲水脂序列 (amphipathic sequence) (图 1, 白色方框)。这些序列在环境因子激活蛋白后, 可能会相互作用, 引起胞质内的 C-端构象变化, 从而有利于自身磷酸化 (Robinson *et al.*, 2000)。亲水连接域后面链接第一转移功能域, 它含有一个保守的可自身磷酸化的组氨酸基团 (图 1, H<sub>1</sub>)。这一功能域中  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的交互出现, 对感应激酶的二聚体化 (dimerization) 是十分重要的 (Dutta *et al.*, 1999)。组氨酸残基自身磷酸化后, 磷酸基团转移到 GacS 的第一个接受子天冬氨酸残基上 (图 1, D), 然后又转移到下一个组氨酸残基上 (图 1, H<sub>2</sub>), 这个组氨酸在 GacS 中属于 C-端的 Hpt 功能域。Hpt 功能域作为第二个转移功能域, 将磷酸基团转移到 GacA 保守的天冬氨酸残基上 (图 1) (Pernestig *et al.*, 2001)。磷酸化的 GacA 激活或阻遏调控组件的转录, 从而控制目标基因的表达。*Sinorhizobium meliloti* 的 FixJ 是与 GacA 相似的反应调控因子, 磷酸化使之形成二聚体, 而二聚体也正是 FixJ 与靶标 DNA 高亲和力结合所必需的 (Da Re *et al.*, 1999)。因此 GacS 和 GacA 都是以二聚体形式发挥活性。GacA 与其它反应调控因子一样, 含有一个与 DNA 结合相关的 helix-turn-helix (HTH) 结构域。GacA 识别的 DNA 序列及 GacA 直接调控的基因目前还未知。推测 GacS/GacA 系统对靶标基因的影响是间接的。

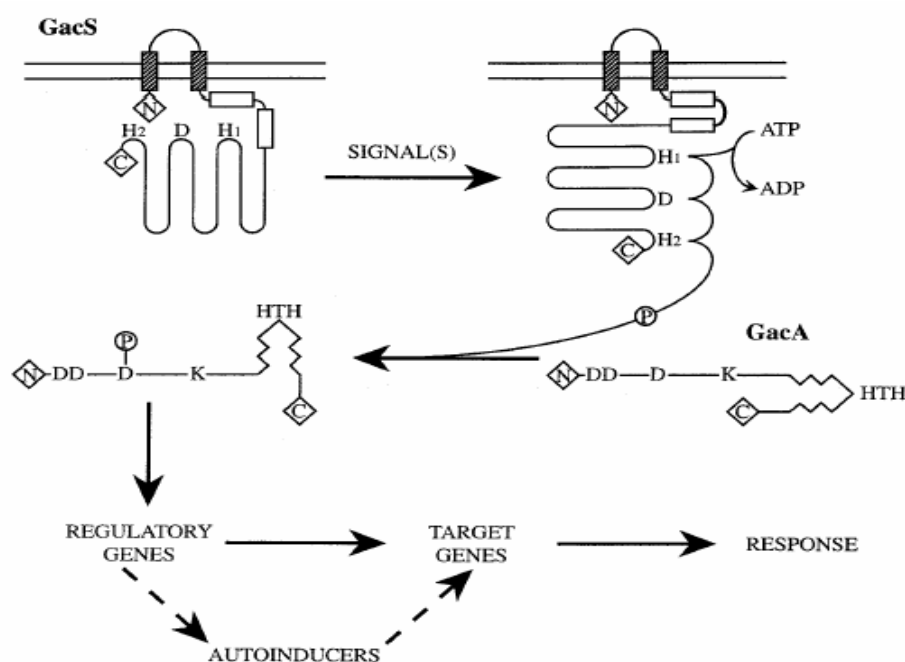


图 1-1 GacS/GacA 双组分调控系统的信号转导途径

Fig.1-1. Model of the signal transduction pathway mediated by the GacS/GacA two-component system

### 1.5.3 GacS/GacA 同源物中的保守结构域

对多种细菌的 GacS 蛋白序列应用 PILEWP 比较确定了三个相似性较高的组：假单胞组，肠细菌组和 *Vibrio fischeri/Shewanella* 组。在假单胞组中，*P. fluorescens* CHA0 和 Pf-5, *P. chlororaphis*, *P. tolaasi*, *P. viridiflava* 和 *P. syringae* 属于同一个亚组，它们与 *P. aeruginosa* 和 *P. putida* 的 GacS 同源性较差。这一聚类数据模式与 16S rRNA 的数据相同，表明 *P. fluorescens* e CHA0, *P. chlororaphis* 与 *P. syringae* 的关系很近 (Ramette *et al.*, 2001)。将上述 GacS 蛋白用 CLUSTALW 软件 (Thompson *et al.*, 1994) 作比较，并作进一步分析表明，转移功能域、接收功能域和 Hpt 输出功能域具有高保守性。连接区作为第四个相关因子 (linker) 也显示出高于平均值的保守性。在 GacS 接收功能域，包含了三个保守区：天冬氨酸-天冬氨酸 (DD)，可磷酸化的天冬氨酸 (D) 和赖氨酸 (K)。在输出功能域，N-端和第三个磷酸化位点周围有两个显著的保守氨基酸残基的峰值。GacS 中同源性较低的区域包括：包含有两个跨膜功能域的周质环 (1~200 残基)，转移区和接收区之间的序列，以及接收区和输出功能域之间的短序列 (800~840 残基)。周质环的保守性相对较差 (Ramette *et al.*, 2001)。

1994 年，Thompson 等用 CLUSTALW 比较了 16 个 GacA 序列，根据已鉴定过结构的反应调控因子，NarL (*E. coli*) 和 FixJ (*Sinorhizobium meliloti*) 来推测 GacA 的二级结构 (Stock *et al.*, 2000)，证实 GacA 蛋白的 N 端接收功能域中，可磷酸化的 Asp-54 残基和与其保守关联的 Asp-8/Asp-9、Thr (Ser) -82 和 Lys-104 是其活性域 (1~148 残基)，在 C 端 DNA 结合结构域 (149~最后的残基) 有一个 Helix-Turn-Helix (HTH) 功能区，可能决定了 GacA 对 DNA 识别的特异性。进行自磷酸化的第一个保守的组氨酸附近，包含 H-box 以及与其相邻的连接功能域可能对配体反应调控子识别和特异性互作具有决定性作用。以 *P. fluorescens* CHA0 的 GacA 蛋白序列作比较，使用 BLAST

程序在 NCBI 的数据库中确认了 GacA 的同源序列 (Bull *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 1997)。GacA 序列成组排列的树状图 (dendrogram) 将四个荧光性假单胞菌的生防菌株 (CHA0, Pf-5, BL915 和 30-84) 聚为一簇, 与 *P. syringae* 和 *P. viridiflava* 的 GacA 蛋白关系较近, 而与 *P. aeruginosa* 和 *P. putida* 的关系较远。如 GacS 的树状图一样, GacA 同源的肠细菌和其它细菌 (*Shewanella* 和 *Xylella*) 都排除在 *Pseudomonas* 组之外。

#### 1.5.4 GacS/GacA 双组分调控系统模型及其相关联因子的研究

以 *P. fluorescens* CHA0 作为材料研究表明: GacA 并不直接与其控制的基因 *hcnABC* 的启动子互作, 而且 *hcnA* 启动子上也没有与 GacA 相关的区域 (Blumer *et al.*, 2000)。当 *hcnA-lacZ* 翻译融合子在 *tac* 启动子控制下表达时, 由于在 *hcnA* 核糖体结合位点附近的一个约 11 bp 核苷酸的序列使这一基因仍受 GacS/GacA 系统的调控, 而且也正是这一区域被 RNA 结合蛋白 RsmA 所抑制, 说明 RsmA 可能是 GacS/GacA 调控级联反应的下游组件 (Blumer *et al.*, 2000)。RsmA 在许多革兰氏阴性和部分革兰氏阳性细菌中对代谢起调控作用。它是一个保守的 RNA 结合蛋白。在 *P. fluorescens* CHA0 中, RsmA 的过量表达抑制了 GacA 控制的靶标基因表达, 包括 *hcnA*, *aprA* (控制胞外蛋白酶) 和 *phlA* (控制 2,4-DAPG 合成), 而 *rsmA* 突变体只是部分抑制了 *gacS* 失活突变所引起的胞外产物的缺失 (Blumer *et al.*, 2000)。

革兰氏阴性细菌中的这一模型的关键部分包括: (1) 在由对数生长阶段向静止阶段转变时, GacS/GacA 系统被激活, 可能主要是通过磷酸化过程, 激活这一系统和使之失活的信号尚不清楚; (2) 激活的 GacA 对控制分泌物产生的调控因子有直接或间接的正调控作用, 如 RsmB 和相关的调控 RNAs; (3) 这些调控 RNA 可以隔离 RNA 结合蛋白 RsmA, 因此可以降低对靶标 mRNA 的翻译抑制。然而 RsmA 和 RsmB 产生的转录后抑制只能说明 GacS/GacA 的调控只具有部分效果, 一定还有其它调控因子的存在。有待发现 GacS/GacA 级联系统中更多的因子来完善它。

*P. fluorescens* Pf-5 和 *E. coli* (Whistler *et al.*, 1998) 研究表明, 静止期的 sigma 因子 (*rpoS* 的产物) 受 GacS/GacA 系统的正调控。因此, 一些依赖 GacS/GacA 的表现型可能取决于 RpoS。在 *P. fluorescens* 中, *rpoS* 和 *gacS/gacA* 的突变体存在不同的表现型 (Whistler *et al.*, 1998; Sarniguet *et al.*, 1995)。目前, 对于 RpoS 和 GacS/GacA 调控系统之间的互作关系有待进一步研究。

*P. aeruginosa*, *P. syringae* 和 *P. aureofaciens* 三种细菌中, GacS/GacA 通过对 N-乙酰高丝氨酸内酯 (AHLs) 合成的正调控而作用于 Quorum-sensing (QS) 机制 (Chancey *et al.*, 1999; Heurlier *et al.*, 2003)。AHLs 也称自体诱导因子 (autoinducer), 许多革兰氏阴性细菌产生这种信号, 通过群体密度介导基因表达 (Fuqua *et al.*, 1998)。在上述三种产生 AHLs 信号的生物中 GacA 通过两条途径调控胞外产物的产生, 一条包括刺激 AHLs 的产生及激活的 AHLs 对靶标基因的转录调控; 另一条不依赖于 AHLs 而是在转录后水平上作用于同一个靶标基因。由 GacA 刺激 AHLs 合成的途径与不依赖于 AHLs 的合成途径是否包括相同的调控因子 (例如 RsmA), 尚须进一步研究。

#### 1.5.5 GacS/GacA 双组分调控系统在植物-病原物互作中的调控研究

GacS/GacA 控制的表现型共同特点是控制合成胞外产物, 即胞外蛋白酶和次生代谢产物

(Aarons *et al.*, 2000; Altier *et al.*, 2000; Whistler *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996)。对植物有益的根围定殖细菌研究表明 (*P. fluorescens* CHA0, Pf-5, BL915 和 F113; *P. chlororaphis* PCL1391 和 *P. aureofaciens* 30-84), GacS/GacA 系统对于合成有抗菌活性的次生代谢产物基因表达是正调控的。这些代谢物包括: 2,4-DAPG, pyoluteorin, pyrrolnitrin, hydrogen cyanide, 2-hexyl-5-propylresorcinol 和 phenazine 类化合物。许多研究表明这些次生代谢物能使生防细菌所定殖的植物抵抗多种真菌的侵染(Haas *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1997)。同一种细菌中, GacS/GacA 系统还对一些胞外酶的基因表达起正调控作用。如: 蛋白酶, 磷脂酶 C (phospholipase C) 和几丁质酶。尽管这些酶在所列出的细菌生防功能中的作用没有专门研究, 但已知胞外蛋白酶和几丁质酶在其它一些细菌菌株中对生防活性起作用。GacS/GacA 系统所起到的负调控功能也有报道: 在 *P. fluorescens* CHA0 中, *gacS* 和 *gacA* 突变体导致 pyochelin 和另一种可能是 pyochelin 的荧光化合物的过量产生 (Schmidli-Sacherer *et al.*, 1997)。

研究表明 GacS/GacA 突变体的特征包括: 1. 导致植物有益的假单胞菌部分或全部丧失生防能力; 2. 导致植物或动物致病细菌的病原毒性显著下降。对 *P. fluorescens* CHA0 的 *gacS* 和 *gacA* 突变体的研究表明, 与野生型相比, 突变菌株在一般培养基上菌落大而扁平, 而在半固体培养基上, 运动性 (motility) 有一定变化 (Schmidli-Sacherer *et al.*, 1997; Goodier *et al.*, 2001), 这说明 GacS/GacA 系统对菌体的表面组分也有影响。

GacS/GacA 系统在多种类型的致病性中起决定性的作用。如在植物病原细菌 *P. syringae* pv. *syringae* B728a 中, GacS/GacA 系统对叶片上形成病斑是必须的, 但对过敏性反应 (HR) 不起作用。丁香霉素 (Syringomycin), 胞外多糖藻酸盐 (polysaccharide alginate) 和胞外蛋白酶都受 GacS/GacA 控制, 而且也可能与病原性相关, 但是这些单独作用都不能造成病害 (Hirano *et al.*, 2000)。*P. syringae* pv. *syringae* B301D-R 在 GacS 控制下修饰一个含 12 个氨基酸的多肽 syringolin。其本身并不抑制真菌, 但是能在水稻中激发防卫相关基因, 从而抵抗稻瘟病菌的侵染, 阻止叶片的坏死 (Waspi U *et al.*, 1998)。在 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 中 *gacS/gacA* 双组分系统控制着 *hrpL*、*hrpRS*、*ahlI/ahlR*、*rpoN*、*rpoS* 以及双组分调控系统 *rsmA/rsmB* 的转录, 其中 *rpoN* 和 *hrpRS* 调控 *hrpL* 的转录, 而 *hrpL* 控制毒性基因、无毒基因和 *hrp/hop* 基因的转录; *ahlI/ahlR* 调控与群体感应相关的基因, *ropS* 控制胁迫相关基因和次级代谢产物的表达。*gacA* 的缺失导致上述基因转录水平的下降和影响 Pst 菌的毒性、繁殖、HR、群体感应、运动性和色素的产生 (Chatterjee *et al.*, 2003)。在 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 中的研究表明, 与 *gacS/gacA* 双组分调控系统高度同源的 ExpS/ExpA 系统控制着 Ecc 菌的胞外蛋白酶分泌和毒性, 该系统不但存在于 Ecc 中, 而且也存在于 *E. amylovora*、*E. rhapontici*、*E. herbicola* pv *gypsophylae* 和 *E. herbicola*, 突变 *gacA* (*expA*) 基因, 造成果胶裂解酶基因 *pel-1*, 多聚半乳糖醛酸酶基因 *peh-1*, 纤维素酶基因 *cel-v* 转录水平的下降, 使 Ecc 丧失致病力 (Cui *et al.*, 2001)。Cui 等 (2001) 认为 *Erwinia* spp. 所产生的 Harpin (烟草叶片上激发过敏性反应的蛋白) 也受 GacS/GacA 的调控。

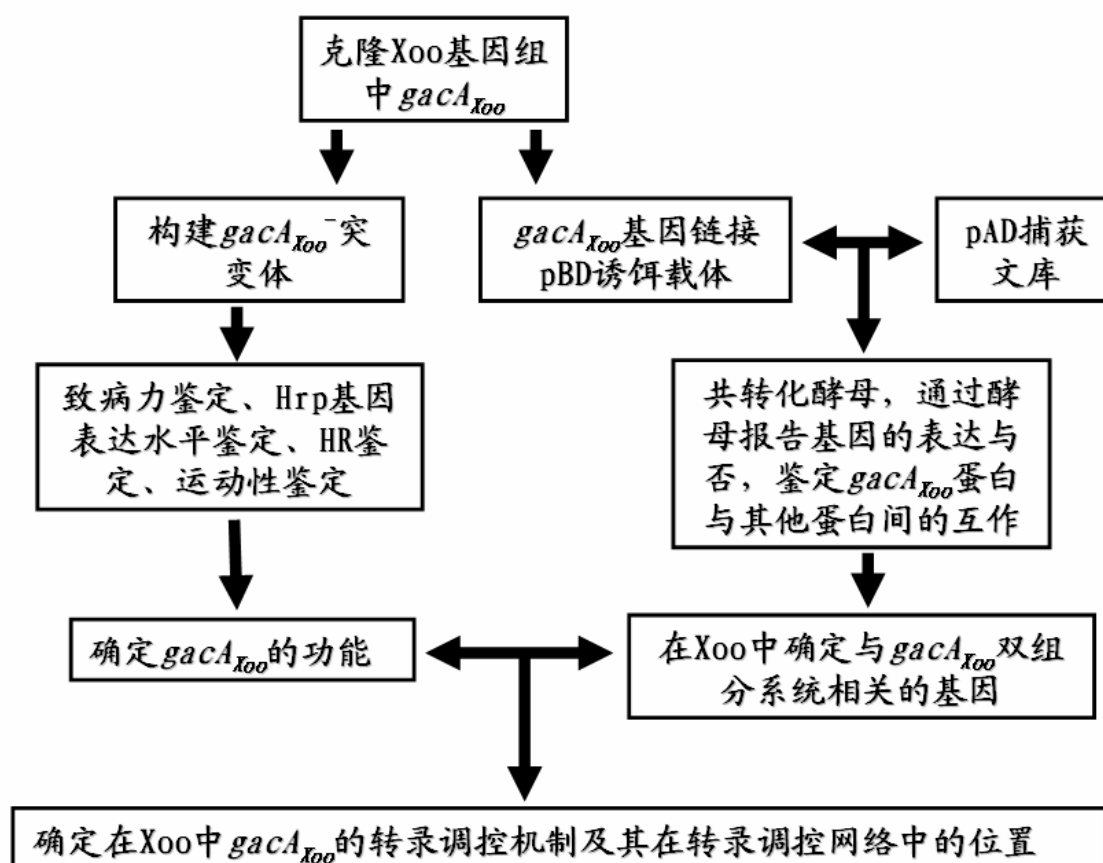


## 1.6 本研究的目的意义和技术路线

### 1.6.1 研究目的和意义

水稻白叶枯病是水稻生产上的一种重要细菌病害,而且水稻—Xoo 是研究植物-病原物互作的模式系统之一,白叶枯病菌和水稻全基因组序列的公布 (Lee *et al.*, 2005; Hirokazu *et al.*, 2005; Yu, *et al.*, 2002) 为阐明 Xoo 致病机理,发现新致病因子提供了有利的条件。GacS/GacA 双组分调控系统存在于许多革兰氏阴性细菌中,其功能涉及到细菌毒性以及与寄主的共生,控制合成胞外产物,即胞外蛋白酶和次生代谢产物。分析其 Xoo 全基因组序列,发现含有单拷贝的 *gacA*,命名为 *gacA<sub>Xoo</sub>*,本研究拟通过标记置换法构建 *gacA<sub>Xoo</sub>* 突变体,采用功能互补方法来确定 *gacA<sub>Xoo</sub>* 的功能;通过 Y2H,研究依赖于 *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因的转录表达调控网络,从转录调控网络方面初步阐明水稻白叶枯病菌的致病机理。

### 1.6.2 技术路线



## 第二章 水稻白叶枯病菌 *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因的功能分析

与多细胞生物相比,作为单细胞生物的细菌要适应更具随机性的生境变化。因此,细菌一方面必须能够检测到外界的环境刺激,将其转化为细胞信号,另一方面又需以此调控自身的新陈代谢、结构和行为,达到趋利避害,正常生长的目的。研究表明,调控这两个信号转导过程的基因不是随机分布于基因组中的,而是具有紧密的联系和精细的结构,其编码的蛋白质之间以磷酸化形式进行着高效多样的信号传递。据其结构特征,研究者将此类系统称为“双组分调控系统”(Nixon *et al.*, 1986),它们调控着细菌细胞的绝大部分生理过程,包括趋化性、碳、氮、磷等营养元素的代谢、渗透性、孢子形成、酶合成、细胞分裂与分化等,也包括病原细菌的毒性、生物被膜(biofilm)形成和群体感应(quorum-sensing)等致病过程(Parkinson and Kofoid, 1992)。

随着多种生物全基因组序列的破译,已经发现双组分系统不仅仅只存在细菌中,在古细菌、真菌、酵母和植物(拟南芥和番茄)等基因组中(Stock *et al.*, 2000)均发现具有特定功能的双组分调控系统。研究表明双组分调控系统起源于细菌并以基因水平转移(horizontal transfer)方式传递给有限的古细菌和真核生物类群,形成辐射进化(Koretke *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000)。对双组分系统分子进化的研究激发了将其作为靶分子,发展新型抗生素的探索(Stephenson *et al.*, 2000)。

GacS/GacA 双组分系统是广泛存在于革兰氏阴性细菌中感应环境信号进而控制基因表达的调控系统(Heeb *et al.*, 2001)。反应调节子 GacA 在丁香假单胞番茄致病变种(*P. syringae* pv. *tomato* DC3000)中作为一个调控等级较高的主控因子,控制了细菌毒性、群体感应性、生物被膜形成、存活、运动性、次生代谢产物产生、毒素合成、胞外多糖产生、胞外酶类和蛋白泌出等表型及其基因表达(Chatterjee *et al.*, 2003)。然而,至今仍不清楚 GacA<sub>Xoo</sub> 对水稻白叶枯病菌致病性及其基因表达的调控作用,以及 GacS/GacA<sub>Xoo</sub> 上、下游的调控网络。本研究试图通过分析 *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因的结构和功能,阐明 GacS/GacA 双组分系统中 *gacA<sub>Xoo</sub>* 在 Xoo 致病性中的调控作用及其机理。

根据已报道的丁香假单胞番茄致病变种 *gacApst* 基因序列在 Xoo 全基因组序列中检索,获得了 *gacA<sub>Xoo</sub>* 的基因序列。GacA<sub>Xoo</sub> 属于 LuxR/uhpA 基因家族成员之一。GacA<sub>Xoo</sub> 与 GacApst 核苷酸序列同源性为 44.9%,氨基酸序列同源性为 42%;二者均具有信号接收结构域 REC 和 HTH-LuxR DNA 结合结构域。

根据 *gacA<sub>Xoo</sub>* 核苷酸序列设计了特异性引物 *gacAF* 和 *gacAR*, 从 Xoo PXO99<sup>A</sup> 基因组 DNA 中扩增并克隆了 *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因。该基因在 Xoo 基因组中为单拷贝,与甘蓝黑腐病菌(Xcc)的 *gacA<sub>Xcc</sub>* 和柑桔溃疡病菌(Xac)的 *gacA<sub>Xac</sub>* 序列同源性达到 100%,表明了 *gacA* 在黄单胞菌中的结构保守性和潜在的功能相似性。用标记置换方法对 *gacA<sub>Xoo</sub>* 进行突变分析。与野生型菌株相比, *gacA<sub>Xoo</sub>* 突变体的运动性减弱。但是突变体的致病性和诱导非寄主植物烟草产生 HR 的能力未发生明显改变。基因功能互补分析表明, *gacA<sub>Xoo</sub>* 能将突变体运动能力恢复到与野生型菌株相同的表型。因此,初步推测 *gacA<sub>Xoo</sub>* 调控了 Xoo 的运动性。

## 2.1 实验材料

### 2.1.1 菌株和质粒

水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)PXO99<sup>A</sup>株系, *E. coli*菌株DH5 $\alpha$ 和JM109, 用于互补分析的广寄主范围载体pHM1均为本实验室保存; 用于构建双交换突变体的质粒pDS132由Schneider Dominique惠赠, 提供庆大霉素抗性基因的质粒pBBR1MCS-5由Peterson Kenneth M惠赠; 克隆载体pMD18-T购自TaKaRa(大连)公司; 实验中所用抗生素浓度为: 卡那霉素(Kan)为25  $\mu$ g/ml; 壮观霉素(Sp)为100  $\mu$ g/ml; 氨苄青霉素(Amp)为100  $\mu$ g/ml, 庆大霉素(Gm)为25  $\mu$ g/ml, 氯霉素(Cat)25  $\mu$ g/ml。

### 2.1.2 生化试剂

限制性内切酶、Taq DNA聚合酶和T4 DNA连接酶购自TaKaRa(大连)公司; 卡那霉素(Kanamycin)购自Sigma公司; 质粒纯化和凝胶回收试剂盒购自鼎国生物公司或者普博欣生物公司; 小牛肠碱性磷酸酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)CIAP购自New England BioLabs公司。其它试剂均为国产分析纯, 购自北京化工厂。

### 2.1.3 培养基和菌株培养条件

培养基:

肉汁胨培养基(NA培养基):

牛肉浸膏	3 g
蛋白胨	7.5 g
蔗糖	10 g

加水至1,000 ml, 调至pH 7.0, 121℃灭菌20分钟。固体培养基加1.5%琼脂。

LB培养基:

细菌培养用蛋白胨	10 g
细菌培养用酵母膏	5 g
NaCl	10 g

加水至1,000 ml, 调至pH 7.0, 121℃灭菌20分钟。固体培养基加1.5%琼脂。

PSA培养基:

细菌培养用蛋白胨	10 g
蔗糖	10 g
谷氨酸	1.0 g

加水至1,000 ml, 调至pH 7.0, 121℃灭菌20分钟。固体培养基加1.5%琼脂。

**M210 培养基:**

酶水解干酪素	8 g
蔗糖	5 g
酵母提取物	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g

加水至 1,000 ml, 调至 pH 7.0, 121℃灭菌 20 分钟。固体培养基加 1.5%琼脂。

**半固体培养基:**

细菌培养用蛋白胨	0.3 g
细菌培养用酵母膏	0.3 g
琼脂	3 g

加水至 1,000 ml, 调至 pH 7.0, 121℃灭菌 20 分钟。

**菌株培养条件及保存:**

PXO99<sup>A</sup>及其突变菌株: 液体培养在 28℃, 200 rpm振荡培养 48 小时; 固体培养在 28℃培养箱培养 48-72 小时。*E. coli*菌株液体培养在 37℃, 200 rpm振荡培养 12 小时; 固体培养在 37℃培养箱生长至 12 小时。Xoo及其突变菌株短期可保存在含有适合抗生素的NA或PSA固体平板上, *E. coli*短期保存在含相应抗生素的LB固体平板上, 均储存于 4℃冰箱, 每 4 周重新划线活化; Xoo和 *E. coli*长期保存采用新鲜培养的液体菌液 600 μl与 80%无菌甘油 400 μl充分混匀, 储存于-70℃。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 Xoo 基因组 DNA 的制备

**快速提取:**

1. 取 1.5 ml过夜培养的Xoo PXO99<sup>A</sup>菌液于离心管中, 12,000 rpm离心 1 分钟, 弃上清, 收集菌体;
2. 加 400 μl 裂解缓冲液(40 mM Tris-醋酸, pH 7.8 的 20 mM 醋酸钠, 1 mM EDTA, 1% SDS), 吹打混匀(枪头去尖);
3. 加 200 μl 5 M NaCl 混匀后, 12,000 rpm 离心 12 分钟(时间不能少);
4. 将上清液移至另一离心管中, 加入 10 μl RNase A (10mg/ml) 37℃温浴 30 分钟;
5. 加入等体积苯酚/氯仿(1:1, v/v)抽提, 充分混匀抽提;
6. 离心收集上清, 用氯仿抽提一次;
7. 12,000 rpm 离心 3-10 分钟, 吸取上清至新 Eppendorf 离心管中;
8. 加 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA 后, 再用 70%乙醇洗沉淀 2 次;
9. 干燥后, 溶于 50 μl TE 或水中。

**大量提取:**

参照《分子克隆实验指南》, 略有改动。

1. 培养 50 ml 细菌培养物至饱和状态, 取 15 ml 培养物, 8,000 rpm, 离心 5 分钟, 弃上清;
2. 沉淀的菌体加入 5,670  $\mu$ l TE, 用吸管反复吹打, 重悬菌体。加入 300  $\mu$ l 10%SDS 和 30  $\mu$ l 20 mg/ml 蛋白酶 K, 混匀, 55 $^{\circ}$ C 温浴 2 小时;
3. 加入 1,000  $\mu$ l 5 mol/L NaCl, 充分混匀, 再加入 800  $\mu$ l CTAB/NaCl (10% CTAB/0.7M NaCl) 溶液, 混匀, 于 65 $^{\circ}$ C 温浴 30 分钟;
4. 加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 混匀, 12,000 rpm 离心 15 分钟, 将上清转至新管中;
5. 加入等体积 (约 8,000  $\mu$ l) 的氯仿/异戊醇(24:1), 混匀, 12,000 rpm 离心 20 分钟, 将上清液转入一个新管中 (如难移出上清, 先用牙签除去界面物质);
6. 加入 0.6 倍体积异丙醇, 轻轻混合直到 DNA 沉淀下来, 用一个封口的巴斯德管将沉淀转移至适量 70%乙醇中洗涤 1 次, 再用无水乙醇洗涤 1 次; (异丙醇沉淀后, 可稍加离心后收集沉淀, 再用 70%乙醇洗涤)
7. 离心 5 分钟, 弃上清, 超净工作台上风干 (勿使沉淀完全干燥, 否则极其难溶);
8. 加入 100-200  $\mu$ l TE 缓冲液或无菌的 ddH<sub>2</sub>O, 4 $^{\circ}$ C 过夜溶解 DNA;
9. 加入 10 mg/ml RNase 至终浓度为 50  $\mu$ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 小时;
10. 加等体积酚/氯仿/异戊醇抽提 1 次, 上清液再用氯仿/异戊醇抽提 1 次;
11. 向上清中加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积预冷的无水乙醇, 倒置混合;
12. 离心后轻轻弃去上清, DNA 沉淀用 70%乙醇和无水乙醇各洗涤 1 次, 稍干后溶于适量 TE 中, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度后, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存 (-20 $^{\circ}$ C 长期保存), 作为 PCR 扩增模板。

### 2.2.2 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因的扩增

Xoo 基因组 DNA 为模板, *gacAF*: 5'-TTGCATCGAGCTTGCCCTGA-3' 和 *gacAR*: 5'-TCACAG CACCCTGGAGGGAT-3' 为引物, 采用 50  $\mu$ l 反应体系 PCR 扩增 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因, 反应体系如下: 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟, 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 57 $^{\circ}$ C 退火 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟), 72 $^{\circ}$ C 延伸补平 5 分钟。扩增产物用浓度为 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。紫外灯下分析电泳结果。反应体系如下:

10 $\times$ PCR buffer	5 $\mu$ l
25 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
10 mmol/L dNTP	1 $\mu$ l
10 $\mu$ mol/L / <i>gacAF</i>	1 $\mu$ l
10 $\mu$ mol/L / <i>gacAR</i>	1 $\mu$ l
Template DNA	20-100 ng
Taq DNA polymerase	2.5 U
Add ddH <sub>2</sub> O to	50 $\mu$ l

### 2.2.3 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因纯化

*gacA<sub>xoo</sub>*基因纯化使用凝胶回收纯化试剂盒(北京鼎国生物公司或者普博欣DNA快速纯化/回收试剂盒)。成分包括:离心柱—含有Resin(树脂),具有吸附DNA的功能,无特异性;溶液B—6 mol/L NaClO<sub>4</sub>, 0.03 mol/L NaAC, pH5.2, 少量酚红;溶液C—200 mmol/L NaCl(pH7.5), 10 mmol/L EDTA(pH7.5), 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 用时用无水乙醇 1:1 混合;溶液D—TE Buffer(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0); 溶液E- NaAc。

操作步骤:

1. 切取含 DNA 片段的琼脂糖凝胶(100~300mg)捣碎, 按重量/体积比 1: 3 (含 DNA 片段凝胶: 溶液 B) 加入溶液 B。
2. 50℃水浴 10 分钟直至凝胶完全溶化, 其间可漩涡振荡三次, 琼脂糖必须完全溶化。如果体积大于 500  $\mu$ l, 可适当增加溶胶时间, 若此时溶液变红, 可加 15  $\mu$ l NaAc。
3. 将溶液置于离心柱中静置 1~2 分钟,  $\geq 8,000$  rpm 离心 30~60 秒, 若一次加不完, 可分两次离心。
4. 倒掉溶液, 加入 500  $\mu$ l 用无水乙醇稀释好的溶液 C 于离心柱中, 8,000 rpm 离心 30~60 秒, 倒掉溶液。
5. 用稀释好的溶液 C 500  $\mu$ l 再洗一次, 8,000 rpm 离心 30~60 秒。
6.  $\geq 15,000$  rpm 再次离心 30~60 秒以甩干剩余液体, 除去残余酒精。
7. 将离心柱置于新的离心管中, 加入 $\geq 50^\circ\text{C}$ 预热的 20~30  $\mu$ l 溶液 D, 混匀, 静置 2 分钟,  $\geq 15,000$  rpm 离心 60 秒, 管底即为所需 DNA。
8. 将 DNA 贮存于-20℃备用。

### 2.2.4 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因的连接与转化

*gacA<sub>xoo</sub>* 基因的连接反应参照 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa) 说明书和 pMD18-T Vector 试剂盒 (TaKaRa) 说明书。

***E. coli* 电击感受态细胞制备及转化:**

1. 新鲜菌落接种 LB 2.5 ml, 37℃ 200 rpm 振荡培养过夜;
2. 转接 (接种量 1%) 300 ml LB, 37℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.3~0.7。
3. 以 3,000 $\times$ g 于 4℃ 离心收获菌体, 用等体积冰冷的 10% 甘油洗涤菌体沉淀两次, 然后重悬于 1/200 培养体积的洗涤液中, 保存于-70℃。
4. 取 1.5  $\mu$ l 连接产物, 加入 30  $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$  电击感受态细胞中, 混匀;
5. 冰上放置 2-3 分钟后, 转入冰预冷的电击杯中, 以 1.8 KV/cm 电击 (采用 BIO-RAD 公司 Pluse Controller 仪);
6. 立即转入 1 ml LB 培养基中, 37℃ 150 rpm 振荡培养 1 小时;
7. 取 200  $\mu$ l LB 培养液, 40  $\mu$ l 20 mg/ml 的 X-gal 和 60  $\mu$ l 200 mg/ml 的 IPTG 涂于含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37℃ 倒置培养 14-16 小时。

***E. coli* 化学感受态细胞制备及转化:**

转化储存液 (2×TSS): 含 100 mM MgCl<sub>2</sub> LB培养基稀释 40% (m/v) 聚乙二醇 (PEG3350) 溶液至 20%, 加入DMSO至 10% (v/v), 调pH至 6.5, 高压灭菌, 4℃保存备用。

方法一: 挑取*E. coli* JM109 的单菌落于 5 ml的LB培养基中, 37℃振荡培养过夜; 取 0.5 ml 过夜培养物加入到 100 ml培养基中, 37℃振荡培养 2.5 小时左右至OD<sub>600</sub>值约为 0.4; 将培养物分装于 2 个 50 ml的离心管中, 冰浴 30 分钟, 4,000 rpm离心 10 分钟; 弃上清, 倒置离心管流尽残余液体, 然后加入TSS转化储存液 1 ml或者 5 ml预冷的 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub>溶液, 冰浴 10 分钟, 每管 100 μl, 分装后保存于-70℃冰箱。

**方法二: Psi 培养液的配制:**

酵母提取物	5 g/L
蛋白胨	20 g/L
硫酸镁	5 g/L

用 1M KOH 调至 pH 7.6 , 121℃高压灭菌后保存备用。

**溶液 TbfI 和 TbfII 的配制:**

溶液	药品	用量	终浓度
Tbf I (200 ml)	醋酸钾	0.588 g	30 mM
	氯化铷	2.42 g	100 mM
	氯化钙	0.294 g	10 mM
	氯化锰	2.0 g	50 mM
	甘油	30 ml	15% v/v
用稀释的醋酸调至 pH 5.8, 用孔径 0.2μm 滤器过滤灭菌			
TbfII (100 ml)	MOPS	0.21 g	10 mM
	氯化钙	1.1 g	75 mM
	氯化铷	0.121 g	10 mM
	甘油	15 ml	15% v/v

用 1M KOH 调至 pH 6.5, 用孔径 0.2μm 滤器过滤灭菌

1. LB平板中挑取DH5 α 单菌落, LB液体培养基中 37℃ 200 rpm培养过夜。取 1 ml过夜培养的菌液加入到 100 ml Psi 培养液 (按比例增加)。37℃培养至A<sub>550</sub>=0.48。
2. 冰浴 15 分钟。
3. 离心沉淀细胞, 5,000 g, 5 分钟。
4. 弃上清, 加入 0.4 倍体积的 TbfI (预冷), 悬浮, 冰浴 15 分钟。
5. 离心沉淀细胞, 5,000 g, 5 分钟。
6. 弃上清, 加入 0.04 倍体积的 TbfII (预冷) 悬浮, 冰浴 15 分钟。每管 100 μl 分装, 液氮速冻, -70℃储存。

取 *E. coli* JM109 或 DH5 α 化学感受态细胞 100 μl 与 5~10 μl 连接产物轻轻混匀, 冰浴 20 分钟; 42℃热激 90 秒后立即转入冰浴中放置 1.5~2 分钟; 加入 1 ml SOB 或 LB 液体培养基, 37℃, 200 rpm 振荡培养 60 分钟, 使 *E. coli* 细胞复苏并表达质粒编码的抗生素抗性基因; 分别取 100 μl、

200  $\mu$ l 转化的菌液铺 LB 平板, 平板中含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素(Amp), 并附加 40  $\mu$ l 20 mg/ml 的 X-gal 和 60  $\mu$ l 200 mg/ml 的 IPTG。37℃倒置培养 14-16 小时, 出现的白色菌落即为转化菌。

## 2.2.5 质粒 DNA 的提取

### 碱裂解法:

1. 新鲜单菌落接种到 3 ml 含相应抗生素的 LB 中, 37℃, 250 rpm 培养过夜;
2. 加入 1.5 ml 菌液于 Eppendorf 管中, 5,000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清;
3. 加入 100  $\mu$ l 预冷的 Solution I (50 mM 蔗糖; 10 mM EDTA (pH8.0); 25 mM Tris-HCl pH8.0), 重悬菌体;
4. 加入 200  $\mu$ l 新鲜配制的 Solution II (0.2 M NaOH, 1%SDS), 上下颠倒几次混匀, 冰浴 5 分钟;
5. 加入 150  $\mu$ l Solution III (每 100 ml 含: 5 M 醋酸钾 60 ml, 冰乙酸 11.5 ml, 蒸馏水 28.5 ml), 轻轻混匀, 冰浴 10 分钟;
6. 12,000 rpm 离心 5 分钟, 上清转入另一管, 用酚/氯仿、氯仿各抽提一次;
7. 用 0.6 倍体积的异丙醇在室温沉淀 10 分钟以上;
8. 12,000 rpm 离心 10 分钟, DNA 沉淀用 4℃ 70%乙醇洗涤后, 于室温晾干;
9. 加入含 RNase A (100  $\mu$ g/ml) 的 TE 20-50  $\mu$ l 溶解。

### 煮沸法:

1. 挑取单菌落, 接种于加相应抗生素的 3 ml LB 培养基中, 200 rpm, 37℃摇菌过夜;
2. 取 1 ml 菌液加入 1.5 ml 离心管, 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃上清, 吸干液体;
3. 加 300  $\mu$ l STET (含溶菌酶 500  $\mu$ g/ml), 振荡混匀, 室温放置 3-5 分钟;
4. 95-100℃加热 40-60 秒;
5. 用牙签挑出底部白色絮状沉淀, 上清液加等体积 (约 300  $\mu$ l) 异丙醇, 混匀;
6. 于-20℃放置 10 分钟或更长, 12,000 rpm 离心 15 分钟, 弃上清, 晾干沉淀;
7. 加 30  $\mu$ l 灭菌的无离子水 (含 100  $\mu$ g/ml 的 RNase A), -20℃保存。

## 2.2.6 用标记置换法构建 $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>* 突变体

标记置换法构建突变体参照 Philippe N 等 (2004) 的方法。

PXO99<sup>A</sup>基因组DNA为模板, rgaF: 5'-CTGCGTGAGTGGCTGCGTAA-3'和rgaR: 5'-CGACGTAAGAAGGGCGTTGACTA-3'为引物, PCR扩增含有*gacA<sub>xoo</sub>*全长基因的DNA片段 (Rga片段), 长度约为 1.4 kb。扩增体系参见 2.2.2, 扩增程序为: 94℃预变性 3 分钟, 35 个循环 (94℃变性 30 秒, 55℃退火 40 秒, 72℃延伸 1.5 分钟), 72℃延伸补平 5 分钟。

设计引物 GmF: 5'CTAATGCATGACGCACACCGTGGAAA3' 和 GmR: 5'ATAATGCATGCGGCGTTGTGACAATTT3', 下划线部分为 *Nsi* I 内切酶位点, 以 pBBR1MCS-5 质粒为模板, 扩增作为突变体筛选标记的庆大霉素抗性基因 *Gm*, 长度为 855 bp, 反应体系和程序同 2.2.2。

连接Rga片段到pMD18-T, 转化*E. coli* 感受态细胞, 获得质粒pMDR18。*Nsi* I 内切酶消化



pMDR18, 切下Rga片段中的*gacA<sub>xoo</sub>*基因。回收Nsi I 内切酶消化后的pMDR18 载体, 载体脱磷: 每 1 µg DNA末端用 10×CIAP buffer 3 µl, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphate) 0.5 单位, 加入ddH<sub>2</sub>O至 30 µl, 37℃保温 1~2 小时, 电泳后通过胶回收。与经过Nsi I 内切酶处理的*Gm*基因连接, 得到质粒pMDR19。

Sal I 和 Xba I 内切酶消化 pMDR19 质粒 DNA, 切下长度约 1.6 kb 的片段, 该片段含有 *Gm* 基因, 在 *Gm* 基因的 5'端和 3'端连接有 Rga 片段。将 1.6 kb 片段与经过 Sal I 和 Xba I 内切酶处理的质粒载体 pDS132 连接, 转化 *E. coli* S-17 感受态细胞, 获得质粒 pRG132, 用于构建 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因突变体。

#### Xoo PXO99<sup>A</sup>电击感受态细胞的制备及转化:

1. 将 Xoo 在 PSA 固体培养基上划线, 28℃倒置培养 1-2 天;
2. 挑取单菌落, 接种于 20 ml M210 液体培养基中, 28℃, 200 rpm 振荡培养过夜;
3. 培养液转接到 500 ml M210 液体培养基中, 28℃, 200 rpm振荡培养至对数生长中期 (OD<sub>600</sub>=0.5 ~ 0.6);
4. 让细菌在冰浴中冷却 20 分钟, 4℃离心收集菌体;
5. 菌体用冰预冷的、经高压灭菌的 10%的甘油洗三次;
6. 最后一次弃去上清后, 靠残余的 10%甘油重悬细菌, 使细菌密度达 10<sup>9</sup>/ml;
7. 按每管 40 µl 分装, 液氮速冻后, 保存于-80℃备用。
8. 取 1 µl (20 ng) pRG132 质粒 DNA 加入 40 µl Xoo 感受态细胞中, 混匀后转移到电击杯中 (1 mm-gap), 轻轻振至杯底;
9. 电击 (V=1.8 KV, C=25 µF, R=200 Ω) 后 (采用 BIO-RAD 公司的 Pluse Controller 仪), 立即转入 1 ml LB 培养基中, 28℃125 rpm 振荡培养 1.5 小时;
10. 涂布于含相应抗生素的 PSA 或 LB 平板, 28℃培养 3 至 7 天。

将突变体质粒pRG132 通过电击导入PXO99<sup>A</sup>电击感受态细胞中, 含*Gm*抗性LB平板筛选转化子, 将在*Gm*抗性平板上生长的菌落重新点接于含氯霉素抗性 (Cat) 的LB平板, pRG132 质粒具有氯霉素抗性基因, 能在*Gm*抗性平板上生长而不能在Cat抗性平板上生长的转化子为所需突变体, 即*Gm*等位置换*gacA<sub>xoo</sub>*, 同时所得Xoo突变体基因组中不含有自杀载体序列。PCR扩增验证突变菌株。

### 2.2.7 构建 *gacA<sub>xoo</sub>* 突变体的互补菌株

以rgaF和rgaR为引物, PCR扩增PXO99<sup>A</sup>基因组DNA中包括自身启动子序列的*gacA<sub>xoo</sub>*基因, 克隆到pMD18-T载体上, 测序鉴定后, 用Kpn I和Hind III双酶切回收约 1.4 kb的片段, 与同样经过同样双内切酶处理的pHM1 载体相连接, 转化*E. coli* 感受态细胞DH5α, 提取阳性克隆中的质粒, 命名pHrga, 将其转入Xoo突变体中, 含壮观霉素抗性PSA平板筛选阳性转化子, 即为其互补产物。

### 2.2.8 $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>* 突变体致病性测试和过敏性反应(HR)分析

将待测细菌在NA平板上活化后, 在含相应抗生素的NA液体培养基中振荡培养 48 小时, 至

10<sup>8</sup> CFU/ml以上, 离心收集菌体, 无菌水稀释菌液至OD<sub>600</sub>为 0.5。用剪叶法将培养好的菌种均匀接种到生长期为 40 天的水稻品种IR24 的二、三心叶上, 温室温度控制在 25-35℃, 湿度达到 90% 左右, 以利于Xoo的发病, 接种 12 和 20 天后, 调查接种水稻叶片的发病情况; 同时将相同浓度的菌液直接注射烟草叶片, 接种 24-48 小时后观察烟草叶片接种部位有无HR反应的产生, 重复三次。

### 2.2.9 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体运动性(motility)检测

运动性检测方法参照She等(2001)的方法, 将待测细菌在NA平板上活化后, 在含相应抗生素的NA液体培养基中振荡培养 48 小时, 至对数生长期, 离心收集菌体, 无菌水稀释菌液至OD<sub>600</sub>=0.5, 取 1  $\mu$ l培养液点接于半固体培养基平板, 28℃温箱培养 4 天或以上, 观察细菌运动痕迹。

### 2.2.10 $\Delta gacA_{xoo}$ 突变体胞外酶活性的检测

#### 1) 胞外木聚糖酶的检测

木聚糖酶的活性检测参照 Keen 等(1996)的方法。离心收集对数生长期的 Xoo, 重悬于 PSA 液体培养基中, 取 2  $\mu$ l 培养液分别点接于含 0.2%RBB-xylan (Sigma)的 PSA 平板, 28℃培养 48 小时后, 能产生木聚糖酶的菌落在蓝色背景下可见一个白色晕圈。

#### 2) 胞外纤维素酶的检测

纤维素酶活性的检测参照 Andro 等(1984)的方法。在 PSA 平板上加入 0.5%的羧甲基纤维素 (Carboxymethyl Cellulose, CMC, Sigma) 及合适的抗菌素。用牙签点接菌落于该平板, 置 28℃培养 24 小时, 然后加入 20 ml 0.1%刚果红染色 30 分钟, 再用 1 M 的 NaCl 溶液洗 2 次, 每次 20 分钟, 能产生纤维素酶的菌落染色后在红色背景下可见一个透明圈。

#### 3) 胞外蛋白酶的检测

蛋白酶活性参照 Tsuchiya 等(1982)的方法。在 PSA 平板上加入终浓度为 2%的脱脂奶粉及合适的抗菌素, 然后用牙签点接菌落于平板表面, 置 28℃培养 48 小时, 能产生胞外蛋白酶的菌株在菌落周围形成一个水解脱脂奶粉的透明圈。

### 2.2.11 *gacA<sub>xoo</sub>* 序列的生物信息学分析

测序分析 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因核苷酸序列, 输入 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 GenBank 数据库进行核酸和氨基酸序列同源性分析 (BLASTN 和 BLASTX), 蛋白结构分析通过 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 CDS 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行。序列分析采用的软件为 DNASTar 7.1 (DNASTAR, Inc. USA)、DNAMAN 6.0 (Lynnon Biosoft, Canada)、BioEdit 7.0 (Isis Pharmaceuticals, Inc. CA)。质粒载体图谱采用 SimVector 4.2 (PREMIER Biosoft, CA) 软件绘制。引物设计采用 Primer premier 5.0 软件 (PREMIER Biosoft International, CA) 和 Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Inc. USA)。

## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因克隆

Xoo全基因组序列的发表 (Lee *et al.*, 2005) 使得克隆Xoo基因组中任何一个基因成为了可能。根据丁香假单胞番茄致病变种*gacApst*基因序列在Xoo全基因组序列中检索, 获得了*gacA<sub>xoo</sub>*的基因序列, 采用引物*gacAF/gacAR*, 以PXO99<sup>A</sup>基因组DNA为模板, PCR扩增*gacA<sub>xoo</sub>*基因, 获得 720 bp 的片段 (图 2-1)。克隆该片段并进行测序分析。DNASar软件分析*gacA<sub>xoo</sub>*具有长度为 648 bp 的完整开放阅读框 (ORF)。

以pBBR1MCS-5 质粒为模板, 采用引物GmF/GmR扩增庆大霉素抗性基因*Gm*, 扩增产物长度为 855 bp, 作为突变体筛选标记 (图 2-2)。PXO99<sup>A</sup>菌株不具有庆大霉素抗性, 其基因组DNA中无*Gm*扩增产物 (图 2-2)。

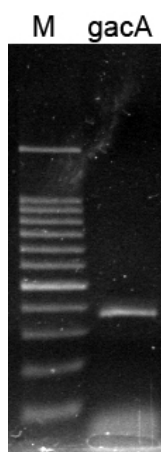


图 2-1 *gacA<sub>xoo</sub>* PCR 扩增

Fig.2-1. The PCR production of *gacA<sub>xoo</sub>*

M. 200 bp ladder

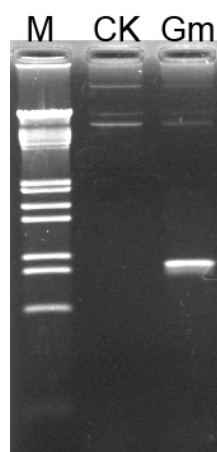


图 2-2 *Gm* 基因 PCR 扩增

Fig.2-2. The PCR production of *Gm*

M. Lambda DNA/ *EcoR* I + *Hind* III

CK. PXO99<sup>A</sup> Gm. pBBR1MCS-5

### 2.3.2 *gacA<sub>xoo</sub>* 生物信息学分析

根据测序结果搜索 Xoo 全基因组序列, 发现在 Xoo 基因组中 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因为单拷贝, 全长 648 bp, 编码 215 个氨基酸 (图 2-3), 推测分子量为 23.2 kD, 富含亮氨酸 (Leu), 不含色氨酸 (Tyr)。SMART 程序分析显示 *GacA<sub>xoo</sub>* 属于 LuxR/UhpA 蛋白家族成员, 该家族成员 N-端具有信号识别受体 (REC) 结构域, 接受磷酸基团, 负责与信号分子的结合; C-端具有一个 Helix-turn-Helix (HTH) 结构域, 负责结合启动子 DNA。*GacA<sub>xoo</sub>* 蛋白序列的 C-端 27 氨基酸至 140 氨基酸之间为 REC 磷酸受体结构域, 在 170 氨基酸到 227 氨基酸之间为 HTH DNA 结合结构域, HTH 结合到所调控靶基因的启动子区域, 激活基因的转录 (图 2-4)。

1	ATGACCATCAGAGTTTTCTGATCGACGATCATGCGCTCGTGCGTACAGGCATGAAGATGATTCTGTCCAAG
1	M T I R V F L I D D H A L V R T G M K M I L S K
73	GAAAGTGGATGTCTGTGTGGTCGGCGAGGCAGAAAAGCGGCGAAGCCGCATTGCCGCAAAATTCGTCAACTCAAG
25	E V D V C V V G E A E S G E A A L P Q I R Q L K
145	CCGGACATCGTGCTGTGCGACCTGCATTTGCCTGGCGTCAGTGGCCTGGAAAATCACCAGCGCATCGTCAAG
49	P D I V L C D L H L P G V S G L E I T E R I V K
217	GGCGATTACGGCACCCGCGTCATCATTGTCTCCGTGCTCGAAGACGGCCCGCTCCCCAAGCGACTGCTCGAA
73	G D Y G T R V I I V S V L E D G P L P K R L L E
289	GCGGGTGCCTCCGGCTATGTGGGCAAGGGCGGCGACGCGCACGAGCTGCTGCGCGCGGTACGTGAAGTCGCG
97	A G A S G Y V G K G G D A H E L L R A V R E V A
361	CTGGGGCGGCGTTATCTCGGCAACACGATCGCGCAGAACCTGGCGCTATCCAATCTGGAAGGGGGGGGCTCA
121	L G R R Y L G N T I A Q N L A L S N L E G G G S
433	CCGTTTCGATGCATTGTCCCCACGCGAGCTGGAAGTGGCCTTGCTGTTGACTCAGGGTCTGCGCCAGGAAGAC
145	P F D A L S P R E L E V A L L L T Q G L R Q E D
505	ATCGCCAAAGCGCCTGAACCTCAGCGCCAAAGACCATCAATACGCACAAAGCGCGCTTGTTCGAAAAGGTGCGC
169	I A K R L N L S A K T I N T H K A R L F E K V G
577	ATCCAGGACAAACATCGCGCTGGCACGGTTGGCCAAACAGTATGGCCTGACCGATCCCTCCAGGGTGCTGTGA
193	I Q D N I A L A R L A N Q Y G L T D P S R V L *

图 2-3 *gacAxoo* 序列图

Fig.2-3. The sequence of *gacAxoo* gene

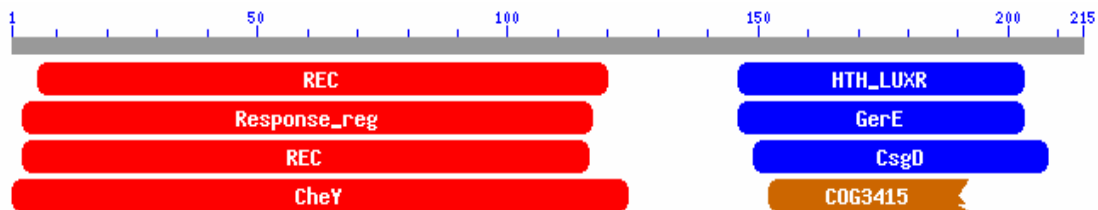


图 2-4 GacAxoo 保守结构域分析

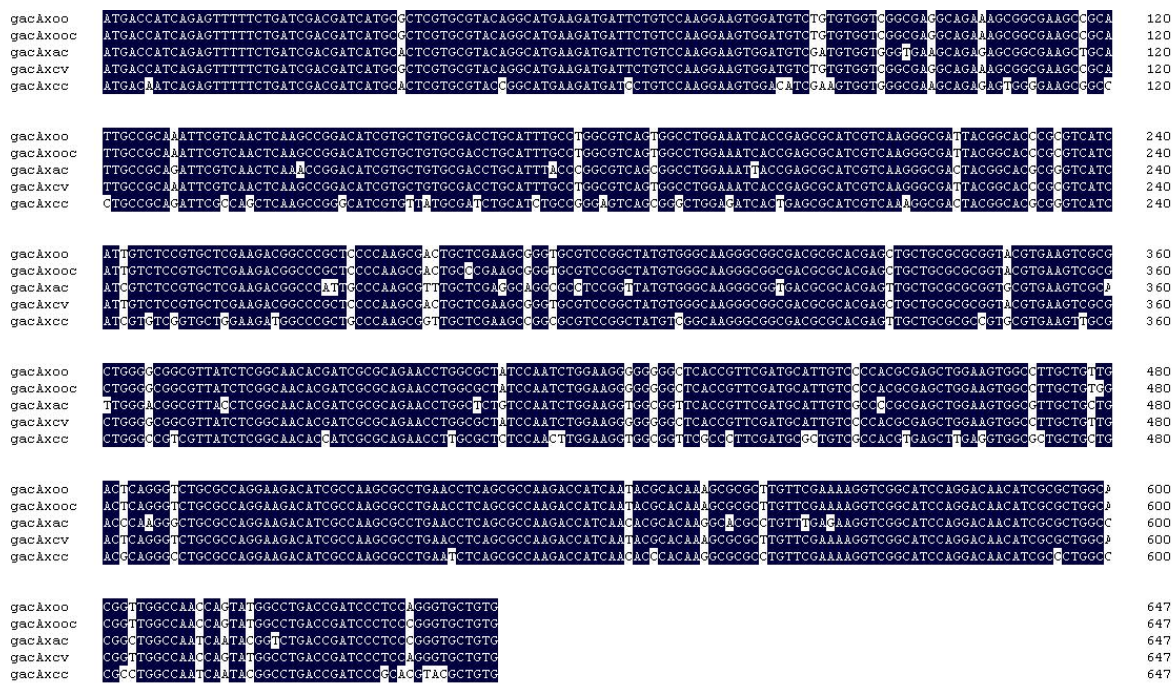
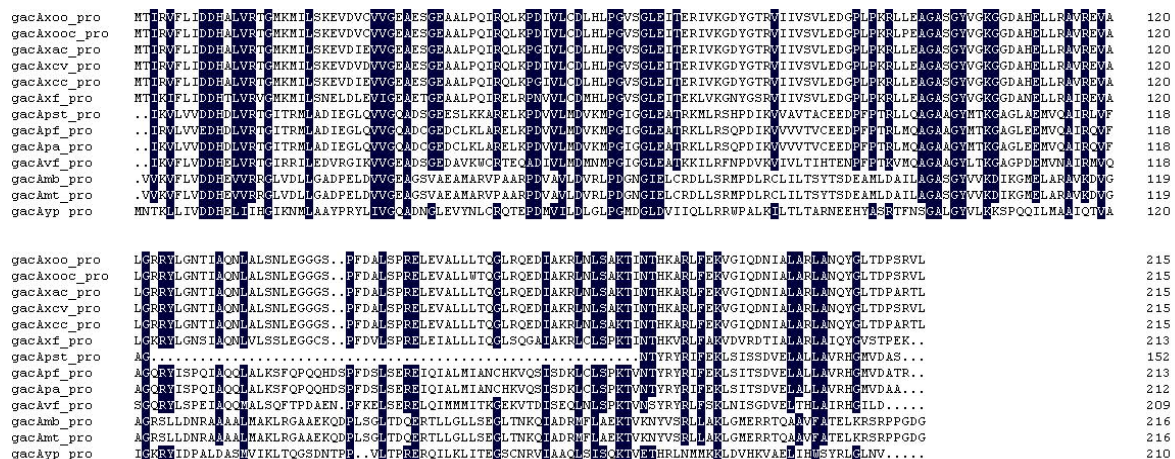
Fig.2-4. The conserved domain of GacAxoo

选取 6 个属 13 种病原细菌或共生菌（寄主包括人类、动物、植物）进行核苷酸序列和氨基酸序列同源性比对。核苷酸比对结果(图 2-5)显示 *gacAxoo* 基因与水稻条斑病菌(*Xooc*)的 *gacAxooc* 同源性为 99.7%; *Xac* 的 *gacAxac* 为 90%; *Xcc* 的 *gacAxcc* 为 86%; 辣椒斑点病菌 *Xcv* 的 *gacAxcv* 为 90%; *X. fastidiosa* 的 *gacAxf* 为 67.27%; *P. syringae* pv. *tmato* 的 *gacApst* 为 50%; *P. fluorescens* 的 *gacApf* 为 55.11%; *P. aeruginosa* 的 *gacApa* 为 54.89%; *V. fischeri* 的 *gacAvf* 为 47.47%; *Mycobacterium bovis* 的 *gacAmb* 为 45.76%; *M. tuberculosis* 的 *gacAmt* 为 45.76%; *Yersinia pestis* 的 *gacAye* 为 43.36%。*Xanthomonas* 属的 *gacA* 基因核苷酸同源性为 95.28% (图 2-6)，氨基酸序列同源性达到了 98%以上 (图 2-7)，可见 GacA 蛋白在黄单胞菌属中是非常保守的。GacAxoo 与 *X. fastidiosa* (Xf) 的 GacA 同源性为 77.67%; 与其它细菌的 GacA 蛋白约有 38-44%的同源性 (图 2-8)。系统发育聚类分析显示实验所选 13 种细菌分为四类：第一类为黄单胞菌属与 *X. fastidiosa* 9a5c; 第二类为假单胞菌属与 *V. fischeri* ES114; 第三类为 *Y. pestis* CO92; 第四类为分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) (图 2-9)。



39



图 2-6 黄单胞菌属 *gacA* 核苷酸序列同源性比对Fig.2-6. Nucleic acid alignments of *gacAxoo* with *GacA* gene of other *Xanthomonas* bacteria图 2-7 黄单胞属 *GacA* 氨基酸序列同源性分析Fig.2-7. Amino acid alignments of *GacAxoo* with *GacA* protein of other *Xanthomonas* bacteria图 2-8 *GacA* 氨基酸序列同源性分析Fig.2-5. Amino acid alignments of *GacAxoo* with *GacA* protein of other bacteria

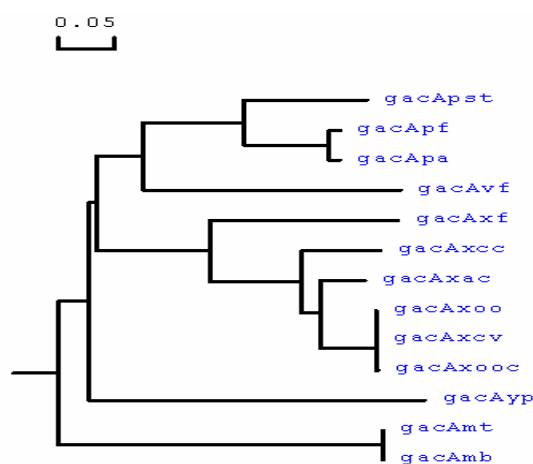


图 2-9 *gacA* 系统发育聚类分析

Fig.2-9. Phylogenetic analysis of *gacA* in thirteen species bacteria

### 2.3.3 构建 $\Delta_{gacA}$ 突变体菌株

根据 *gacAxoo* 基因上下游相邻核苷酸序列设计引物 rgaF/rgaR, 用于扩增含有 *gacAxoo* 基因的 Rga 片段, 长度约为 1.4 kb, 该片段含有 *gacAxoo* 基因及其上下游各 400 bp 的序列, 用于构建 *gacAxoo* 基因突变体质粒。Δ*gacAxoo* 基因突变体质粒构建流程如图 2-10。

将pRG132 质粒导入Xoo, 因为pRG132 质粒内的*Gm*基因两侧为Rga片段, Rga::Gm片段与Xoo基因组内Rga片段通过同源重组, 发生双交换(图 2-11), *Gm*基因等位置换Xoo基因组内的*gacA<sub>xoo</sub>*基因, 同时从Xoo基因组染色体剔除pDS132 质粒载体序列。由于pDS132 质粒含有蔗糖致死基因*sacB*(图 2-12), 所以含有该质粒的细菌不能在PSA平板上生长。pDS132 质粒复制需要  $\pi$  基因产物的存在, PXO99<sup>A</sup>不含有该基因, 所以pDS132 及其衍生质粒不能在Xoo中进行复制。

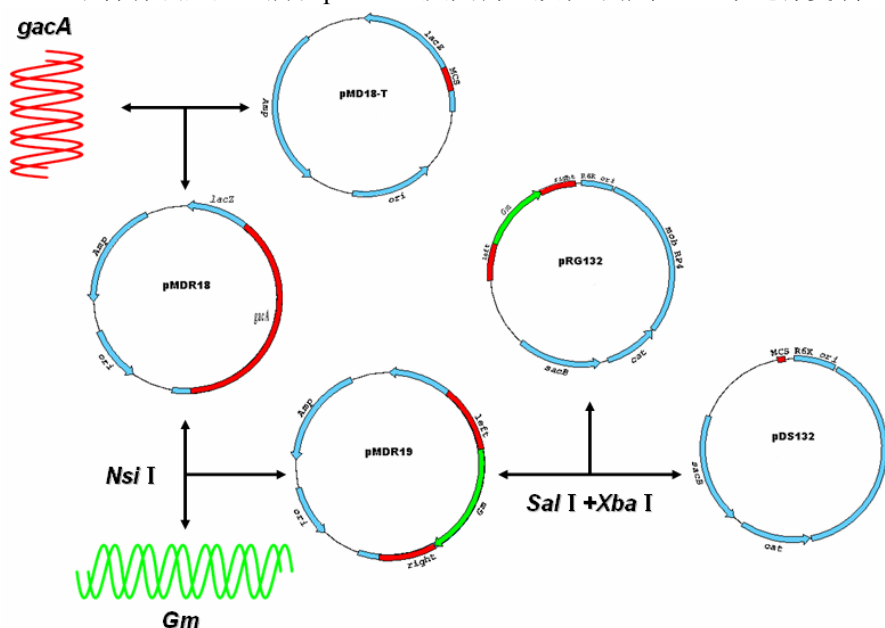
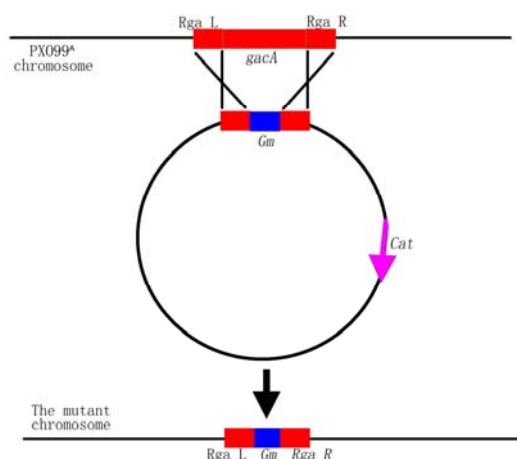


图 2-10 标记置换法构建 *gacAxoo* 突变体流程图

Fig.2-10. The flow chart of constructing *gacA<sub>xoo</sub>* mutant using marker exchange

图 2-11 标记置换法构建 *gacA<sub>xoo</sub>* 突变体示意图Fig.2-11. Model of constructing *gacA<sub>xoo</sub>* mutant using marker exchange

PCR扩增*Gm*基因验证*gacA<sub>xoo</sub>*突变体的正确与否, 由于PXO99<sup>A</sup>不具有*Gm*抗性, 分析Xoo全基因组序列不含有*Gm*基因, 因此选用*Gm*基因做为筛选突变体的抗性标记, 引物GmF/GmR扩增结果表明在PXO99<sup>A</sup>野生型菌株中无长度为 850 bp的*Gm*基因扩增产物, 而具有长度为 720 bp的*gacA<sub>xoo</sub>*基因扩增条带; 在突变菌株中扩增结果则与此相反, 不具有*gacA<sub>xoo</sub>*扩增条带, 而有*Gm*扩增产物(图 2-13)。由于*Gm*基因比所置换的*gacA<sub>xoo</sub>*基因长约 200 bp, 引物rgaF/rgaR在PXO99<sup>A</sup>野生型菌株中的扩增条带要比突变菌株的扩增条带小约 200 bp(如图 2-13)。PCR结果验证获得 $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>*菌株。

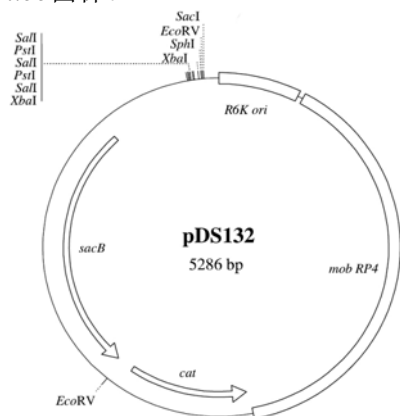
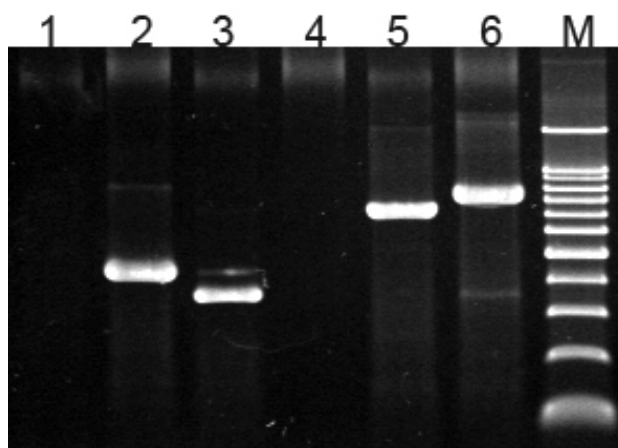


图 2-12 pDS132 载体

Fig.2-12. pDS132 vector

图 2-13 PCR 检测 *gacA<sub>xoo</sub>* 突变体Fig.2-13. PCR analysis of  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>*

1,3,5 PXO99<sup>A</sup> 2,4,6  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>*  
 1-2 GmF/R primers 3-4 *gacAF/R* primers  
 5-6 *rgaF/R* primers M. 200bp ladder

### 2.3.4 $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>* 基因突变体的互补分析

广范围寄主载体 pHM1 上有一个来源于 pUC19 的多克隆位点(图 2-14), Sm/Sp 为质粒提供链霉素和壮观霉素的抗性; *mob* 位点赋予质粒具有运动能力(接合转移时必须); *par* 位点能提高



质粒在宿主细胞中的稳定性；为便于克隆，质粒上存在一个 *Lac* 启动子控制的来源于 pUC19 的多克隆位点，其中 *EcoR* I、*Sac* I、*Kpn* I、*Sal* I、*Pst* I、*Hind* III 为单一位点，可用蓝白斑筛选重组克隆。

通过引物 rgaF/rgaR PCR 反应获得包括自身启动子部分的 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因，片段长度为 1.4 kb，并引入两个限制性酶切位点，*Kpn* I 和 *Hind* III。PCR 产物回收连接到 pMD18-T 载体，用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后定向克隆到同样经双酶切的 pHM1 载体上，使 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因只在自身启动子的作用下转录、翻译，而不受质粒上 *Lac* 启动子的影响。构建好的重组质粒，命名为 pHrga，通过电转化导入  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>* 感受态细胞中。

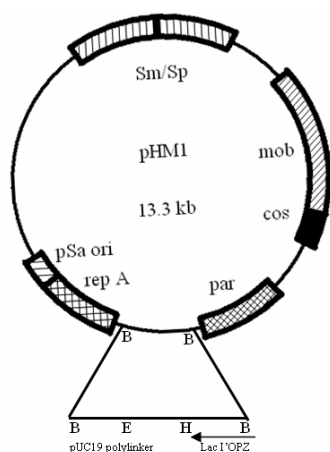


图 2-14 互补分析载体 pHM1

Fig.2-14. pHM1 vector for complementation

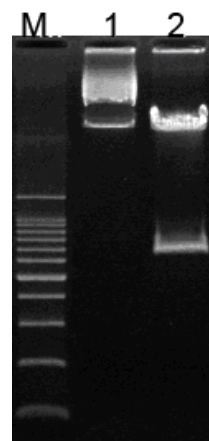


图 2-15 pHrga 酶切验证

Fig.2-15. The restriction digestion analysis of pHrga

M. 200 bp ladder. 1. PXO99<sup>A</sup>. 2. pHrga/*Kpn* I+*Hind* III

为确证通过广范围寄主载体 pHM1 已把 *gacA<sub>xoo</sub>* 导入到突变体中，首先在含庆大霉素抗性的 PSA 平板及含庆大霉素和壮观霉素双抗性的 PSA 平板上分别培养突变体及互补突变系，转接互补菌株三次以上，从互补菌株中提取质粒，*Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切分析质粒，结果如图 2-15 所示，一个互补突变菌株质粒含有 Rga 片段，说明重组克隆已进入 Xoo 并稳定存在，命名互补菌株为  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>*::C。

### 2.3.5 $\Delta$ *gacA<sub>xoo</sub>* 突变体 HR 诱导能力和致病性测试

将 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>* 在 28℃ 条件下振荡培养至 10<sup>8</sup> CFU/ml 以上，离心收集菌体，无菌水稀释菌液至 OD<sub>600</sub>=0.5。用剪叶法将稀释好的菌种 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>* 均匀接种到生长期为 40 天的感病水稻品种 IR24 的二、三心叶上，每个菌株接种叶片 15 张。温室温度控制在 25-35℃，湿度达到 90% 左右，以利于 Xoo 的发病，接种后 12 天和 20 天调查白叶枯病的发病情况，详细记录其病斑长度，取其中有代表性的 3 片发病叶片，测量其病斑长度，重复接种一次，取 6 次测量的均值作图。同时将相同浓度的菌液直接注射烟草叶片，接种 24-48 小时后观察烟草叶片接种部位有无 HR 反应的产生。

野生型 PXO99<sup>A</sup> 和突变体  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>* 在感病寄主水稻上致病力无差异（图 2-16）；突变体  $\Delta$  *gacA<sub>xoo</sub>* 仍能引起非寄主植物烟草的 HR（图 2-17），与野生型并无差异，说明 *gacA<sub>xoo</sub>* 与 Xoo 致病

性无关。在丁香假单胞番茄致病变种 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 中 *gacA* 作为一个顶级调控子，通过调控 RNA、转录激活子和  $\sigma$  因子来影响 Pst 的致病性 (Chatterjee *et al.*, 2003); *E. carotovora* subsp. *carotovora* 通过 *gacS/gacA* 的同源物 *expS/expA* 双组分调控系统控制其它的双组分系统、胞外酶分泌和 Harpin<sub>Ecc</sub> 的产生，进而影响 Ecc 的致病性 (Cui *et al.*, 2001)。由此可见，Xoo 致病性调控途径明显不同于 Ecc 和 Pst。

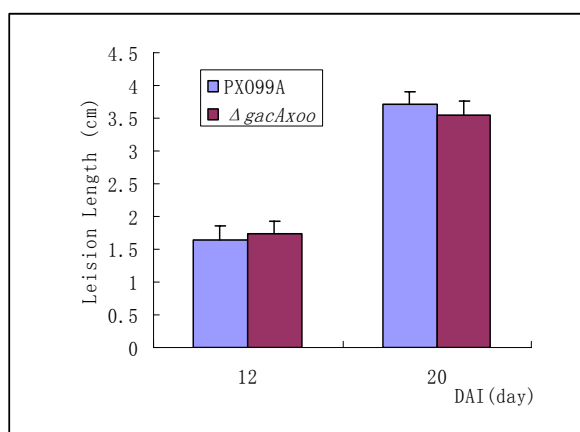


图 2-16 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta gacAxoo$  致病性分析

Fig.2-16. The pathogenicity test of PXO99<sup>A</sup> and  $\Delta gacAxoo$



图 2-17 PXO99<sup>A</sup> and  $\Delta gacAxoo$  HR 测试

Fig.2-17. The HR test of PXO99<sup>A</sup> and  $\Delta gacAxoo$

### 2.3.6 $\Delta gacAxoo$ 突变体运动性分析

将野生型 PXO99<sup>A</sup>、突变菌株  $\Delta gacAxoo$  和互补菌株  $\Delta gacAxoo::C$  分别接于含相应抗生素的 NA 或者 M210 液体培养基中，28℃ 振荡培养 48 小时，至对数生长晚期，离心收集菌体，无菌水稀释菌液至 OD<sub>600</sub>=0.5，取 1 μl 培养液点接于半固体培养基，28℃ 培养箱培养 4 天或以上，观察各个菌株的运动痕迹。

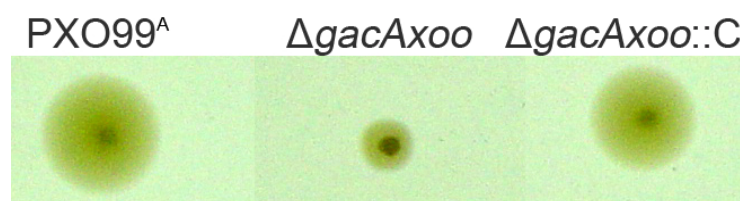
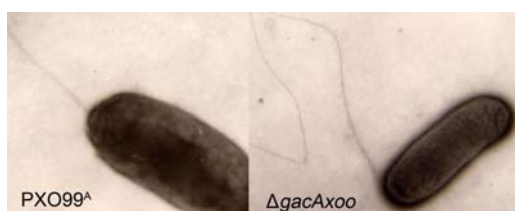


图 2-18 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta gacAxoo$  和  $\Delta gacAxoo::C$  运动性分析

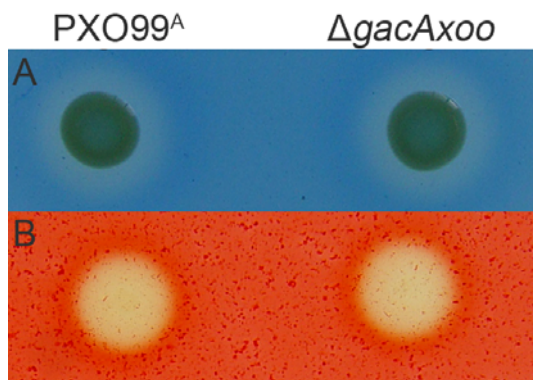
Fig.2-18. Semisolid plate analysis of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta gacAxoo$ ,  $\Delta gacAxoo::C$

三种菌株在培养第一天观察时，在半固体培养基上几乎看不到运动的轨迹，但是第二天以后运动明显加速 (图 2-18)，这说明 Xoo 的运动是受到培养基中某些物质的诱导。培养四天后，测量菌株运动形成的菌斑大小，发现  $\Delta gacAxoo$  的运动能力相比 PXO99<sup>A</sup> 极大的减弱，但是仍然具有运动性 (图 2-18)， $\Delta gacAxoo::C$  恢复至野生型运动水平。电镜观察  $\Delta gacAxoo$  和 PXO99<sup>A</sup> 显示，二者同样具有鞭毛 (图 2-19)。

图 2-19 PXO99<sup>A</sup>和  $\Delta gacAxoo$  菌株鞭毛的电镜观察Fig.2-19. Electron micrograph showing the flagellum of PXO99<sup>A</sup>(left) and  $\Delta gacAxoo$  (right)

### 2.3.7 $\Delta gacAxoo$ 突变体胞外酶活性分析

在革兰氏阴性植物病原细菌中，纤维素酶、果胶酶及蛋白酶等胞外酶类是重要的致病因子 (Andro *et al.*, 1984; Schell *et al.*, 1988)。因此，我们分析了PXO99<sup>A</sup>和  $\Delta gacAxoo$ 胞外酶类活性。野油菜黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *campestris*) 8004 分泌的胞外酶主要是纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶，检测不到木聚糖酶的分泌；而Xoo PXO99<sup>A</sup>几乎不分泌淀粉酶和蛋白酶或分泌量很少，在培养基中很难检测到（结果未显示），纤维素酶及木聚糖酶则有明显的分泌，这可能和它们侵染的寄主不同有关。Xoo几乎只侵染水稻，而水稻的细胞壁中木聚糖的成分可达 60% (Takeuchi *et al.*, 1994)。水稻白叶枯病是一种维管束病害，Xoo在导管中繁殖和扩展，木聚糖酶降解木聚糖，为Xoo提供能量。在Xcc和Xac基因组中还没有鉴定出木聚糖酶基因，表明木聚糖酶的产生可以作为Xoo致病性的特征因子。与野生型相比， $\Delta gacAxoo$ 突变体的胞外纤维素酶和木聚糖酶活性并无明显差异，说明*gacAxoo*基因的突变不影响Xoo纤维素酶和木聚糖酶的活性（图 2-20）。

图 2-20 PXO99<sup>A</sup>和  $\Delta gacAxoo$ 木聚糖酶（A）和纤维素酶（B）活性分析Fig.2-20. Agarose plate assays for cellulase (A) and xylanase (B) activities of PXO99<sup>A</sup> and  $\Delta gacAxoo$ 

## 2.4 讨论

长期以来，水稻白叶枯病是全球水稻栽培区特别是亚洲地区危害非常严重的细菌性病害之一，由水稻白叶枯病菌 Xoo 侵染引起，该菌的寄主特异性强，只侵染水稻及少数野生稻品种，Xoo 与水稻的互作符合典型的基因对基因 (gene-for-gene) 关系，是分子植物病理学中研究植物与病原物互动的重要模式系统 (Daniels *et al.*, 1993)。随着全基因组测序技术的成熟和发展，越来越多的物种完成了基因组测序，包括多种植物病原细菌，使得发现新的基因和新的致病性因子更为快捷和方便。

*GacS/GacA* 双组分调控系统存在于多种细菌中, 帮助细菌细胞根据环境信号做出适应性反应。本研究根据丁香假单胞番茄致病变种 *gacApst* 基因序列搜索 Xoo 全基因组序列, 发现单拷贝的 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因, 对其进行了生物信息学方面的分析。近年来已有多个 *gacA* 和 *gacS* 基因被克隆, 其中 *gacA* 基因在 DNA 和氨基酸水平上具有高度的相似性, *gacA<sub>xoo</sub>* 基因在黄单胞菌属是高度保守的, 我们采用标记置换方法构建了  $\Delta gacA<sub>xoo</sub>$ , 并对突变体的致病力、运动性、过敏性反应等方面进行了分析。

标记置换法产生突变造成基因的失活、并对突变体进行功能互补是研究病原细菌致病相关基因功能常用的方法。选择自杀载体对于成功获得突变体菌株非常重要。合适的自杀载体应该容易进行遗传操作, 具有方便后期筛选的抗性标记, 同时不能在靶标菌中复制。根据以上条件, 经过多次实验, 本研究最终选择了 pDS132 质粒作为构建 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因突变体的自杀载体。pDS132 载体具有氯霉素抗性基因, 区别于用作筛选突变体的标记基因庆大霉素抗性基因; 蔗糖致死基因 *sacB* 的存在使得含有 pDS132 质粒的菌株不能在含有蔗糖的培养基上生长, 为筛选双交换突变体提供了很大的方便, 有效的抑制了单交换突变体的产生, 从而减少了插入突变产生的极性效应。pDS132 质粒复制需要  $\pi$  基因产物的存在, PXO99<sup>A</sup> 不含有  $\pi$  基因, 因此 pDS132 不能在 Xoo 中复制、扩增。上述因素为成功制备 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因突变体打下了良好基础。

本研究采用电击将外源质粒 DNA 导入 Xoo 感受态细胞中, 对于电击条件进行了摸索, 发现当电压低于 1.2 kV 和高于 2.2 kV 时, 不能获得转化子。可能是电压低于 1.2 kV 时, 电脉冲不足以使 Xoo 细胞膜形成瞬间穿孔, 外源 DNA 不能进入 Xoo 细胞内; 电压高于 2.2 kV 时, 过高的电压使 Xoo 细胞死亡过多, 也不能获得转化子。本研究采用 1.8 kV 和 2.0 kV 电击转化 Xoo, 对 Xoo 细胞造成的伤害较小, 同时保证了较高的转化效率, 成功获得了  $\Delta gacA<sub>xoo</sub>$  突变体。

pRG132 突变体质粒 DNA 导入 Xoo 细胞后, 庆大霉素基因两侧 Rga 片段与 Xoo 染色体上相应片段同源重组, 发生双交换事件, 庆大霉素基因等位置换 *gacA<sub>xoo</sub>*。实验中发现当两侧 Rga 片段长度均大于 400 bp 时, 获得双交换突变体的概率大大增加, 而低于 400 bp 尤其是低于 200 bp 时, 几乎不能获得双交换突变体。因此采用标记置换法通过双交换事件获得突变体时, 应使标记基因两侧用于同源重组的片段长度大于 400 bp, 增加发生同源重组的概率。

与野生型比较, *gacA<sub>xoo</sub>* 缺失后突变菌株仍具有很强的致病性, 其在感病寄主上的病斑长度和野生型相比没有明显差异, 而且仍然可以激发非寄主植物烟草的过敏反应; 突变菌株胞外纤维素酶和木聚糖酶活性没有发生变化; 突变体的生物被膜 (biofilm) 形成无明显变化。上述结果表明在 Xoo 中, *gacA<sub>xoo</sub>* 的作用与已经发表的文献有很大的不同, 在 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Chatterjee *et al.*, 2003)、*P. fluorescens* CHA0 (Schmidli-Sacherer *et al.*, 1997)、*E. carotovora* pv. *carotovora* (Cui *et al.*, 2001) 和 *Serratia plymuthica* IC1270 (Ovadis *et al.*, 2004) 等细菌中 *gacA* 基因全局性地调控细菌的各种生命活动, 包括次生代谢物产生、胞外酶分泌、致病力等性状。个人认为出现这种结论也具有一定的合理性, 已有文献研究表明 *gacS/gacA* 系统在不同的细菌中调控不同的基因表达, 影响的性状也不相同, 细菌表现出不同的生理生化反应和生态适应性 (Whistler *et al.*, 1998)。同时, 分析 Xoo 全基因组序列显示, XOO1109 具有与 *gacA<sub>xoo</sub>* 基因相同的结构域, 二者核苷酸和氨基酸序列同源性均低于 30%, 但是不排除 XOO1109 具有与 *gacA<sub>xoo</sub>* 相似的功能, 因此 *gacA<sub>xoo</sub>* 突变后, 突变菌株的胞外酶类活性和致病力并没有表现出明显变化, 可能是因为基

因冗余的原因。

细菌的鞭毛 (Flagella) 是重要的毒性因子, 在农杆菌 (*A. tumefaciens*) 中发现失去鞭毛的突变体在向日葵上的致病性减弱 (Chesnokova *et al.*, 1997)。在某些植物—病原物互作系统中, 鞭毛相关的趋化性在互作早期也具有重要作用 (Vande Broek and Vanderleyden, 1995)。Feng 等 (1975) 研究发现 *Xoo* 对感病水稻品种分泌物具有趋化性, 对非亲和水稻则不然, 这说明进入水稻体内之前, 趋化性在 *Xoo* 接近侵染位点的过程中具有一定作用。水稻白叶枯病菌是单根极生鞭毛细菌, 它通过叶片的水孔或伤口侵染水稻, 定殖在通水组织, 然后进入维管束。鞭毛的运动可能在 *Xoo* 进入植物叶片组织前有利于病菌到达侵染位点。一旦进入植物细胞内, 鞭毛就不再起毒性作用。从 *Xoo* 中已分离到包含四个 ORF 的鞭毛蛋白合成基因簇。其中一个 ORF 为 *flhF*, 编码 GTP 结合蛋白, *flhF* 的突变使其运动能力减弱, 然而, 剪叶接种试验表明, 水稻叶片上并不表现致病性的降低, 说明一旦细菌进入水稻细胞后, 运动性对细菌毒性并无影响 (Shen *et al.*, 2001)。然而目前黄单胞菌属细菌的鞭毛形成机制及其在致病性方面的详细作用机制还不清楚, 植物病原细菌中的鞭毛是否在毒性因子的分泌过程中起重要作用还未可知。*gacA<sub>Xoo</sub>* 突变后, 与野生型比较运动性发生了明显的减弱, 互补分析突变菌株运动能力恢复到野生型水平, 电镜观察突变菌株显示, 突变菌株与野生型同样具有鞭毛。推测突变体菌株运动能力减弱而不是丧失可能是 *Xoo* 存在其它的调控途径或基因, 部分分担了 *gacA<sub>Xoo</sub>* 的功能。

在 *Pseudomonas*、*Erwinia*、*Escherichia*、*Vibrio* 和 *Salmonella* 五个属中均存在 *gacA* 直系同源基因, 分别是 *gacA*、*varA*、*expA*、*uvrY* 和 *sirA*。为了方便, 本研究统一用 *gacA* 来代表。五个基因的氨基酸序列一致性超过 54%, 其功能具有保守性, 均调控次生代谢物产生和细菌毒性, 在 *E. carotovora*、*P. syringae*、*P. aereofaciens*、*P. marginalis* 和 *P. viridiflava* 中还调控胞外酶类产生 (Goodier *et al.*, 2001)。根据以上研究结果, *gacA* 最初功能或许并不是调控细菌毒性, 上述五个属中的细菌其毒性基因对于各自病原菌都是非常特异的, 而且在非致病细菌中也存在 *gacA* 同源基因, 推测 *gacA* 可能在识别目前所调控的各个属的细菌毒性基因之前就已经通过基因水平转移而进入到这些细菌的基因组中, 因此 *GacA* 功能应该具有进化保守性。在 *S. typhimurium* 和 *E. coli* 中 *gacA* 位于鞭毛基因簇之间, 而且突变 *S. typhimurium*、*E. coli*、*P. aeruginosa*、*P. fluorescens* 和 *V. cholerae* 中的 *gacA* 同源基因, 均导致这些细菌运动性减弱或丧失。说明 *gacA* 是鞭毛调控子家族成员之一 (Goodier *et al.*, 2001)。采用 microarray 技术分析 PXO99<sup>A</sup> 与  $\Delta gacA_{Xoo}$  基因表达谱的差异, 表明在  $\Delta gacA_{Xoo}$  中, *fleQ*、*flgC*、*fliC*、*fliO* 和 *cheA* 表达均下调 (本实验室资料), 上述基因位于 *Xoo* 鞭毛基因簇, 表明 *GacA<sub>Xoo</sub>* 确实参与了 *Xoo* 运动性调控。

*GacA* 调控细菌的运动性可能是其古老的功能, 而且具有进化保守性。该功能的鉴定具有很重要的作用, 它可以帮助我们发现到底是哪种环境或者生理信号激活了 *gacA*。 $\gamma$ -变形菌纲细菌寄主范围非常广, 可以引起人类、动物和植物病害, 如果能获得在这些寄主中均具有活性的信号物质, 可能将会是科学史上的里程碑。

综上所述, *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因在黄单胞菌中是保守的, 突变该基因后, *Xoo* 的致病力、胞外酶类活性和过敏反应无明显变化, 但是突变菌株运动能力发生显著减弱, 推测 *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因可能参与了 *Xoo* 运动性相关基因表达的调控, 而且调控细菌的运动性及鞭毛相关基因的表达可能是 *GacA* 的最初功能。

### 第三章 酵母双杂交系统分析与 GacA<sub>Xoo</sub> 互作的相关蛋白

酵母双杂交系统利用酵母 GAL4 蛋白是由两个独立亚基组成的这一特性,构建了分别含有不同亚基基因的质粒载体,并将已知基因构建在其中的一个载体(诱饵载体)上,将另一个已知基因或 cDNA 文库构建在第二载体(捕获载体)上,当蛋白彼此之间发生相互作用时,蛋白在空间的彼此结合将启动酵母基因的转录,通过下游的报告基因筛选相互作用的蛋白。

Y2H 已经广泛应用于分子植物病理学研究,利用该系统证明了 Pto 与 AvrPto 之间的相互作用,为“基因对基因学说”提供了最为直接的分子证据(Tang *et al.*, 1996b);在 Xoo 基因组中 *flhF* 位于鞭毛基因簇, *flhF* 的突变可导致 Xoo 运动能力急剧减弱,通过 Y2H 发现 FlhF 为抗病蛋白 XA21 的作用底物(Shen *et al.*, 2001);植物病原细菌的 II 型、III 型和 IV 型分泌系统对于其致病性具有非常重要的作用,通过设计精巧的蛋白传输系统,产生各种与致病有关的毒性因子和效应子(effector)(Koster *et al.*, 2000)。利用 Y2H 验证了玉米细菌性茎腐病菌(*E. chrysanthemi*)的 II 型分泌系统组成蛋白之间的互作关系(Douet *et al.*, 2004)。在柑橘溃疡病菌中,通过双杂交系统以 *hrp*、*hrc* 和 *hpa* 蛋白为诱饵,从基因组水平上发现了与 III 型分泌系统发生相互作用的新蛋白基因,阐述了已知蛋白的新功能,提出了关于柑橘溃疡病菌致病性的新假说(Marcos *et al.*, 2004);以 VirB 为诱饵蛋白,验证了 IV 型分泌系统组成蛋白之间的互作,同时发现了该系统中与 VirD 发生作用的新蛋白(Marcos *et al.*, 2005)。柑橘溃疡病菌基因组中 XAC1990 为分泌伴侣基因 *flgN*, Y2H 分析 FlgN 与鞭毛蛋白 FlgK 和 FlgL 结合互作,在鞭毛的正确组装过程中具有重要作用(Khater *et al.*, 2007)。

本实验采用 CLONTECH 公司 2001 年推出的 MATCHMARKER library Construction & Screeningkit, 该试剂盒中诱饵载体为 pGBKT7, 捕获载体为 pGADT7。操作流程参见图 3-1。

该试剂盒的特点: 1. 将文库的构建和筛选过程结合在一起,利用 SMART 技术简化了 cDNA 合成的步骤,在合成的 cDNA 两端分别加上了 SMART III 和 CDS III 序列; 2. 利用同源重组介导克隆将 cDNA 片段克隆到同样含有 SMART III 和 CDS III 序列的线性 pGADT7-Rec 载体中,形成 AD 融合文库; 3. 文库构建和筛选能够在相同的宿主菌中并且在同一天进行; 4. 增加了报告基因,大大减少了假阳性的概率, *ADE2*, *HIS3* 和 *MEL1* 交配或共转化筛选双杂交系统中相互作用的蛋白,减少了假阳性的概率; 5. 此系统简化了下游双杂交阳性克隆的分析程序。

本研究以 GacA<sub>Xoo</sub> 为诱饵蛋白,通过 Y2H 从 Xoo cDNA 文库中筛选与 *gacA<sub>Xoo</sub>* 发生互作的相关基因。分离到一个具有 TonB-Dependent-Receptor (Tdr) 结构域的蛋白 Tdrxoo。序列分析显示, Tdrxoo 由 969 个氨基酸组成, 1-23 个氨基酸为信号肽, 55-167 个为 plug 结构域, 608-969 个为 TonB-Dep-Rec 结构域;该蛋白具有接收胞外信号功能的胞外环和跨膜功能的反向  $\beta$ -折叠桶结构。由于 Tdrxoo 与细菌外膜蛋白同源,推测其可能是位于细菌外膜,接收来自细菌体外、目前尚不清楚的环境信号。



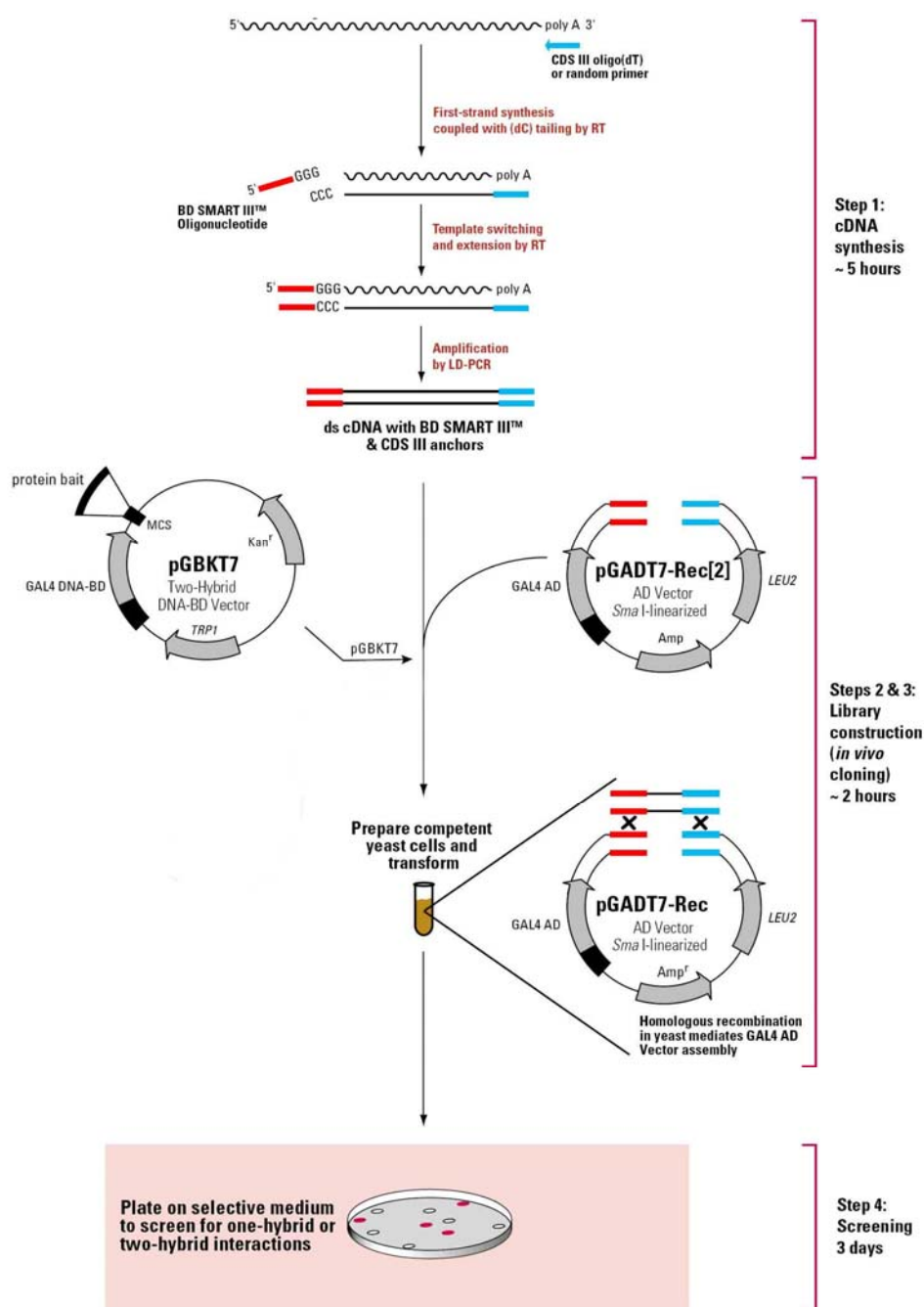


图 3-1 酵母双杂交系统流程图

Fig.3-1. The flow chart of yeast two-hybrid system

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 菌株和质粒

酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* AH109, 诱饵载体 pGBKT7, 捕获载体 pGADT7 购自 CLONTECH 公司, pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司, *E. coli* DH5  $\alpha$  本实验室保存。抗生素用量参见 2.1.1

### 3.1.2 生化试剂

酵母双杂交试剂盒购自 CLONTECH 公司, cDNA 文库构建所需试剂均包括在该试剂盒中。试剂盒内容详细清单可登录 <http://www.bdbiosciences.com> 或者 <http://www.clontech.com> 网站查询。

X- $\alpha$ -Gal、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa (大连) 公司; 无 RNA 酶活性的 DNA 酶 (RQ1 RNase-Free DNase) 购自 Promege 公司; 卡那霉素 (Kanamycin) 和氨苄青霉素 (Amp) 购自 Sigma 公司; 质粒纯化和胶回收试剂盒购自鼎国生物公司或者普博欣生物公司; 其它试剂均为国产分析纯, 北京化工厂产品。

### 3.1.3 培养基和培养条件

LB 培养基见 2.1.3。

YPDA 培养基:

蛋白胨 (poly) peptone	20 g
酵母粉 yeast extract	10 g
腺嘌呤 adenine hemisulfate	30 mg

加水至 950 ml, 调 pH 至 5.8, 121℃ 灭菌 20 分钟, 冷却至 55℃, 加 50 ml 40% 过滤灭菌的葡萄糖。固体培养基加 2% 琼脂。

SD 选择性培养基:

无氨基酸酵母氮源	6.7 g
琼脂	20 g

加水至 850 ml, 调 pH 至 5.8, 121℃ 灭菌 20 分钟, 冷却至 55℃, 加 50 ml 40% 过滤灭菌的葡萄糖和 100 ml 过滤灭菌的所需的 10×Dropout 溶液。

PEG/LiAc: (现配现用):

50% PEG 4000 (polyethylene glycol)	8 ml
10×TE	1 ml
10×LiAc	1 ml
合计	10 ml

酵母裂解缓冲液:

Trito X-100	10 ml
SDS	5 g
NaCl	2.9 g
Tris (pH8.0)	605.7 mg
EDTA (pH8.0)	186.1 mg

### 3.1.4 酵母菌株的活化

取出 -70℃ 条件下保存的酵母菌株 *S. cerevisiae* AH109, 在 YPDA 固体培养基上划线活化, 30℃ 培养 3 天。制备酵母感受态细胞要选取保存在 4 周内的 2-3 mm 的酵母单菌落。



## 3.2 实验方法

### 3.2.1 制备双酶切诱饵载体 pGBKT7

从试剂盒中取出 0.5  $\mu$ l 环状 pGBKT7 载体质粒，余下载体仍保存在 -70℃。化学转化法导入 *E. coli* DH5  $\alpha$  感受态细胞，挑取单克隆于 5 ml 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基，37℃ 振荡培养过夜，碱裂解法提取质粒（见 2.2.5）。采用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pGBKT7 载体，酶切体系为：

10×K buffer	5 $\mu$ l
pGBKT7 载体	10 $\mu$ l
<i>Eco</i> R I (15U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Bam</i> H I (15U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	33 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l

37℃ 酶切 3 小时以上，1% 琼脂糖凝胶电泳检测，EB 染色，紫外灯下观察。DNA 回收试剂盒回收纯化酶切质粒载体，取 3  $\mu$ l 电泳检测浓度，余下可 -20℃ 长期保存或用于下一步实验。

### 3.2.2 制备 *gacA<sub>xxx</sub>* 诱饵质粒

PXO99<sup>A</sup> 全基因组 DNA 为模板，*gacA*F2: 5'-CGCGAATTCATGACCATCAGAGTTTTTCT-3' (*Eco*R I) *gacA*R2: 5'-TTAGGATCCTCACAGCACCTGGAGGGAT-3' (*Bam*H I) 为引物（下划线为内切酶位点），扩增 *gacA<sub>xxx</sub>* 基因，扩增体系和程序参见 2.2.2，为了减少 PCR 扩增过程中引入的错误碱基，采用具有高保真性 *pfu* DNA 聚合酶。试剂盒回收 PCR 扩增产物，将回收产物进行双酶切，体系参见 3.2.1，酶切时间调整为 5 小时至过夜。回收纯化酶切产物，-20℃ 可长期保存。

加 A 反应体系：

10×buffer	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2 $\mu$ l
dATP (10 mM)	0.4 $\mu$ l
<i>pfu</i> DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
PCR 产物	16.2 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l
72℃，15-20 分钟	

*gacA<sub>xxx</sub>* 与 pGBKT7 载体连接，反应条件为：

10×buffer	1 $\mu$ l
双酶切 pGBKT7 载体	1 $\mu$ l
双酶切 <i>gacA<sub>xxx</sub></i>	7 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (350 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
总体积	10 $\mu$ l

16℃ 连接 6 小时或过夜。连接产物转化 *E. coli* DH5  $\alpha$  感受态细胞，提取质粒，酶切验证 *gacA<sub>xxx</sub>*

插入的正确性,选取两个正确插入 *gacA<sub>Xoo</sub>* 的克隆,采用 pGBKT7 载体多克隆位点上游的 T7 primer 进行插入片段测序,验证插入的 *gacA<sub>Xoo</sub>* 读码框是否正确。

### 3.2.3 Xoo 总 RNA 提取

采用热酚法提取 Xoo 总 RNA,所用的器皿和药品的处理参照《分子克隆实验指南》:

酸性酚配制:将结晶酚置于 55℃ 水浴中,直至完全溶化,然后加入等体积 150 mmol/L NaAc (用冰醋酸调至 pH4.0),充分混匀,于 4℃ 静置备用。

1. 离心收集的 Xoo 菌体迅速加入 10 ml 沸腾的裂解液 (1%SDS、0.1 mol/L NaCl、8 mmol/L EDTA,高压灭菌),100℃ 剧烈混匀 1.5 分钟;
2. 加入等体积的酸性酚,64℃ 剧烈振荡 6 分钟;
3. 离心 (12,000 rpm 离心 10 分钟),取上层水相;
4. 重复用酸性酚抽提一次;
5. 加入等体积酸性酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1),室温抽提一次;
6. 加入氯仿/异戊醇 (24:1),室温抽提两次;
7. 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc 溶液 (pH 5.3) 和 2 倍体积无水乙醇;
8. 混匀后,置于 -20℃ 沉淀 3 小时以上或过夜;
9. 离心 (12,000 rpm, 4℃, 20 分钟),弃掉上清液;
10. 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次;
11. 离心获得沉淀,真空干燥后,溶于适量的无 RNase 污染的水中,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度后置于 -20℃ 冰箱保存 (可于 -80℃ 长期保存)。

### 3.2.4 RNA 样品中残余 DNA 去除

反应体系如下:

RNA 样品	1-8 $\mu$ l
10 $\times$ Reaction Buffer	1 $\mu$ l
RQ1 RNase-Free DNase	1 U/ $\mu$ g RNA
无 RNase 污染的水加至总体积为	10 $\mu$ l

1. 37℃ 处理 30 分钟;
2. 加入 90  $\mu$ l 无 RNase 污染的水,混匀;
3. 加入 100  $\mu$ l 氯仿/异戊醇 (24:1),抽提一次;
4. 取上清,加入 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc 溶液 (pH5.3) 和 2 倍体积无水乙醇;
5. 混匀后,置于 -20℃ 沉淀 3 小时以上或过夜;
6. 离心 (12,000 rpm, 4℃, 20 分钟),弃掉上清液;
7. 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次;
8. 离心获得沉淀,真空干燥后,溶于适量的无 RNase 污染的水中,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。

### 3.2.5 cDNA 文库的构建

#### 3.2.5.1 第一链 cDNA 的合成

1. 在无菌的 0.2 ml 的离心管中混合以下试剂：
 

RNA 样品 (0.025-1.0 µg), 对照反应应用 1 µg control RNA	2 µl
CDS III/6 primer 引物	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	1 µl
总体积	4 µl
2. 混合反应成分并简单离心。
3. 72℃温浴 2 分钟。
4. 冰浴冷却 2 分钟, 简单离心。
5. 加以下成分于反应管中:
 

5×First-Strand Buffer	2 µl
DTT	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
M MLV 反转录酶	1 µl
总体积	9 µl
6. 用手指轻弹混匀, 再简单离心, 42℃温浴 10 分钟。
7. 加 1 µl SMART III Oligonucleotide。
8. 42℃温浴 1 小时。
9. 在 75℃加热 10 分钟, 以终止第一链合成反应。
10. 在室温下冷却后, 加 1 µl (2 U) RNase H。
11. 在 37℃温浴 20 分钟。
12. 第一链 cDNA 用于下一步实验或者储存在-20℃, 在-20℃储存时间可达到 3 个月。

#### 3.2.5.2 第二链 cDNA 的合成

1. 加以下成分于 0.2 ml 的 PCR 反应管:
 

第一链 cDNA 反应液	2 µl
10×Advantage 2 PCR Buffer	10 µl
50×dNTP Mix	2 µl
5'PCR primer	2 µl
3'PCR primer	2 µl
10×GC-Melt Solution	10 µl
50×Advantage 2 Polymerase Mix	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	70 µl
总体积	100 µl

2. 轻弹管壁混匀，简单离心。
3. 放入预热至 95℃ 的 PCR 仪
4. 扩增程序为：95℃ 预变性 30 秒，30 个循环（95℃ 变性 10 秒，68℃ 延伸 6 分钟，从第一个循环开始，以后每个循环增加 5 秒钟延伸时间），最后 68℃ 补平 5 分钟。
5. 循环完成后，取 7  $\mu$ l PCR 产物，用 1 kb DNA marker 和 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测，理想的（典型的）结果是在泳道中呈现 0.4-1 kb 的弥散条带。
6. 进行下一步实验或者储存双链 cDNA 于 -20℃。

### 3.2.5.3 CHROMA SPIN+TE-400 Column 纯化双链 cDNA

1. 从塑料袋中取出 CHROMA SPIN 柱，倒转几次以充分混匀内容物，95  $\mu$ l 样品使用一个柱。
2. 垂直拿起纯化柱，掰断底部，将柱子尾部放入 2 ml 的收集管中，去掉顶盖，保存顶盖和白色尾盖。
3. 700 g 离心 5 分钟，离心后柱身呈半干，这一步是为了净化平衡缓冲液，重新形成柱床。
4. 离心后，去除收集管和平衡缓冲液。
5. 将柱子放入 1.5 ml 的离心管中，缓慢将 95  $\mu$ l cDNA 样品加到柱床中心的表面，不要让样品顺着管壁流失。
6. 700 g 离心 5 分钟，去除柱子和收集管，纯化样品在收集管底部。
7. 混合两次实验样品，加入 1/10 体积的 NaAc（3 M，pH 4.8）和 2.5 倍体积的 95% 冰冷乙醇，温和地内外旋转离心管以混匀样品。
8. 将离心管放在 -20℃ 静置 1 小时（也可选择 -20℃ 沉淀过夜，回收效果更佳）。
9. 室温下 14,000 rpm 离心 20 分钟。
10. 小心去除上清，不要搅起沉淀。
11. 简单离心，使所有液体都集中在离心管底部。
12. 小心去除所有液体，干燥 10 分钟
13. 用 20  $\mu$ l 无离子水重悬沉淀，温和地混匀。
14. 至此，用于与 pGADT7-Rec 体外结合的 cDNA 已经制备完毕。可进行下一步实验或者储存 cDNA 于 -20℃ 直到做结合实验。

### 3.2.6 酵母菌株感受态细胞的制备

1. 挑一个保存在 4 周以内的 2-3 mm 的酵母单菌落于盛有 1 ml YPDA 培养基的 1.5 ml 离心管中，振荡，打散菌体。
2. 将 1 ml 内容物全部转入盛有 50 ml YPDA 液体培养基的 300 ml 三角瓶中，30℃，230-250 rpm 条件下培养 16-18 小时，检测 OD<sub>600</sub> 应大于 1.5，否则重新培养。
3. 转移足够量的过夜培养物于 300 ml YPDA 培养基中（建议用 1000 ml 三角瓶），使 OD<sub>600</sub> 达到 0.2-0.3。
4. 30℃ 振荡培养 3-4 小时，酵母菌液浓度 OD<sub>600</sub> 在 0.5 左右。

5. 20℃ 2,200 rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 用 25-50 ml 预冷的无菌水洗沉淀, 重悬菌体。
  6. 20℃ 2,200 rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 用 1.5 ml 1×TE/LiAc 重悬沉淀。
- 制备好的酵母感受态细胞应立即使用, 不能长期保存。

### 3.2.7 诱饵载体和捕获文库共转化酵母

1. 加下列成分于 15 ml 无菌管中:

双链 cDNA	20 μl
pGADT7-Rec (0.5 μg/μl)	6 μl
pGBKT7-gacA <sub>xxo</sub>	5 μg (≤10 μl)
Herring Testes Carrier DNA (denatured)	20 μl

(转 50 μl Herring DNA 到 1.5 ml 离心管中 100℃热变性 5 分钟, 立即置于冰上。使 DNA 变成单链。在加已变性的 Herring DNA 于 15 ml 离心管中时再重复一次。)

2. 加 600 μl 感受态细胞于含有上述成分的离心管中。
3. 温和振荡混匀。
4. 30℃温浴 45 分钟, 每 15 分钟混匀一次。
5. 加 160 μl DMSO 于离心管中, 混匀, 42℃水浴 20 分钟, 每 10 分钟混匀一次。
6. 冰上 5 分钟
7. 700 g 离心 5 分钟
8. 去除上清, 重悬沉淀于 3 ml YPD Liquid Medium
9. 30℃振荡培养 90 分钟
10. 700 g 离心 5 分钟
11. 去除上清, 重悬沉淀于 600 μl 0.9%NaCl 中。
12. 取 150 μl 转化液铺于 150 mm 三缺培养基 (SD/His-Leu-Trp) 平板。
13. 30℃培养直到菌落长出。
14. 将在三缺培养基平板上生长的菌落复制到四缺培养基 (SD/Ade-His-Leu-Trp) 上, 30℃培养 3-8 天。
15. 选取 Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>Mel<sup>+</sup>的菌落重新划线在 SD/ Ade-His-Leu-Trp/X-α-Gal 平板上, 30℃培养 2-4 天。X-α-Gal 溶于二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, DMF), 直接加入培养基混匀使用时 X-α-Gal 的终浓度为 40 μg/ml; 涂布于已制备好的平板上使用时每个 15-cm 平板加入 200 μl 或者每个 10-cm 平板加入 100 μl 浓度为 4 mg/ml 的 X-α-Gal。
16. 挑取呈现蓝色的菌落进行分析验证。

### 3.2.8 超声波法提取质粒 DNA

1. 挑取在 SD/Ade-His-Leu-Trp/X-α-Gal 显蓝的酵母单菌落于液体培养基中, 振荡 2 分钟打散菌团, 30℃ 230 rpm 培养 20 小时以上。
2. 4,000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 用 1,000 μl 酵母裂解缓冲液悬浮沉淀, 振荡混匀。

3. 超声波处理 30 秒，重复一次。
4. 4,000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，用 200  $\mu$ l 酵母裂解缓冲液悬浮沉淀。
5. 加入等体积酚:氯仿（25:24）抽提，13,000 rpm 室温离心 5 分钟，转上清至一干净离心管中。
6. 加入 1/10 体积的 NaAc（3 M，pH 5.2），2.5 倍体积的无水乙醇室温沉淀，13,000 rpm 离心 10 分钟。
7. 70%乙醇洗涤沉淀，真空干燥，DNA 溶解于 20  $\mu$ l 无菌水中。

### 3.2.9 质粒 DNA 的扩增

*E. coli* DH5  $\alpha$  电击感受态细胞制备以及电击转化从酵母中提取的两种质粒 DNA 详细步骤参见 2.2.4，质粒提取参见 2.2.5。

PCR 方法分析酵母双杂交阳性克隆，扩增体系如下：

10 $\times$ Advantage 2 PCR Buffer	5 $\mu$ l
50 $\times$ dNTP Mix（10 mM）	1 $\mu$ l
5'LD primer（20 $\mu$ M）	1 $\mu$ l
3'LD primer（20 $\mu$ M）	1 $\mu$ l
50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	41 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l

用无菌的移液器枪头蘸取少量新鲜培养的酵母双杂交阳性克隆单菌落菌体于干净的 200  $\mu$ l PCR 管中。加入 50  $\mu$ l 上述 PCR 反应混合液，轻轻地打散菌体细胞，开始 PCR 扩增。扩增程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟，30 个循环（94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，68 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟），最后 68 $^{\circ}$ C 延伸补平 3 分钟。1%琼脂糖凝胶电泳检测分析。

### 3.2.10 互作蛋白的再次验证

酵母感受态细胞制备参见 3.2.6。

在两个无菌的 1.5 ml Eppendorf 管中分别加入：

pGADT7-Tdrxoo	3 $\mu$ l
pGBKT7- <i>gacA<sub>xxx</sub></i>	3 $\mu$ l
Herring Tests Carrier DAN（denatured）	10 $\mu$ l

和

pGADT7- <i>gacA<sub>xxx</sub></i>	3 $\mu$ l
pGBKT7-Tdrxoo	3 $\mu$ l
Herring Tests Carrier DAN（denatured）	10 $\mu$ l

共转化过程参见 3.2.7。

### 3.2.11 阳性克隆质粒 DNA 序列分析

将经过验证的阳性克隆质粒 DNA 送 Invitrogen 公司进行序列测定。序列分析参见 2.2.11。

## 3.3 结果与分析

### 3.3.1 *gacA<sub>xxx</sub>* 诱饵载体的制备

由于试剂盒提供的 pGBKT7 载体为环状质粒 DNA，为了长期保存该质粒，将其通过化学法导入 *E. coli*，同时也避免了反复冻融试剂盒提供的 pGBKT7，导致其污染或者不稳定。根据 pGBKT7 质粒提供的多克隆位点内切酶图谱(图 3-2)，选用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切消化该质粒，回收酶切产物，与经过同样内切酶处理的 *gacA<sub>xxx</sub>* 连接，转化 *E. coli*，提取转化子质粒 DNA，*EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切验证，得到诱饵载体 pGBKT7-*gacA<sub>xxx</sub>* (图 3-3)。

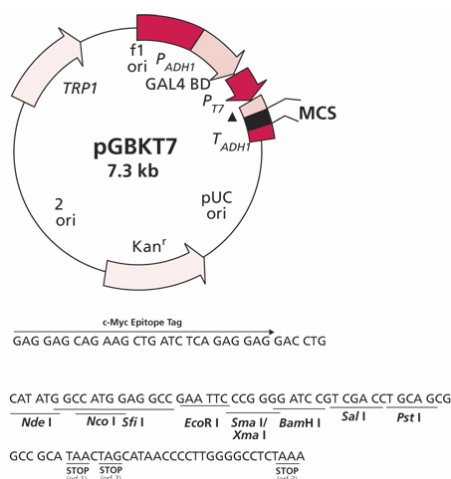


图 3-2 pGBKT7 载体

Fig.3-2. pGBKT7 vector

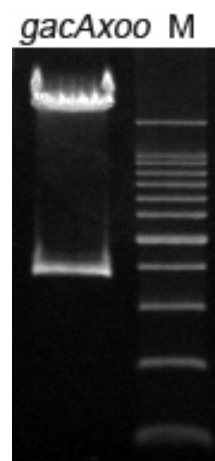


图 3-3 pGBKT7-*gacA<sub>xxx</sub>* 双酶切分析

Fig.3-3. The Restriction digestion analysis of pGBKT7-*gacA<sub>xxx</sub>* by *EcoR* I and *Bam*H I

M. 200 bp ladder

为了在 *gacA<sub>xxx</sub>* 的 5'端和 3'端引入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 内切酶位点，设计引物 *gacAF2* 和 *gacAR2*，扩增 PXO99<sup>A</sup> 基因组 DNA，对 PCR 产物直接进行双酶切，然后回收酶切产物，连接同样经过双酶切处理的 pGBKT7 载体，多次连接均未成功，分析可能是虽然设计引物时在 5'端加入了三个保护碱基，但是当内切酶位点位于 PCR 产物片段的端部时，由于空间位阻的原因，造成内切酶不能正常识别酶切位点，因而连接不成功。针对这个问题，我们先将 PCR 产物连接到普通的 T-载体上，普通 Taq DNA 聚合酶具有在产物末端加 A 的特点，因此连接是很容易的。对于使用 *pfu* DNA 聚合酶扩增得到的 PCR 产物，可以先进行 PCR 产物的末端加 A 反应，再进行 T 克隆。连接成功后根据设计的内切酶位点酶切处理 T 克隆质粒，回收酶切产物，再与 pGBKT7 载体连接，根据调整后的连接方法，我们成功的获得了诱饵载体 pGBKT7-*gacA<sub>xxx</sub>*。

### 3.3.2 提取和纯化 Xoo 总 RNA

RNA 质量的合格与否直接关系到酵母双杂交实验的成败。获得高质量的 RNA，首先要做好前期准备工作，所有用到的玻璃器皿都要经过高温长时间的烘烤，实验所需的离心管和移液器枪头经过 DEPC 溶液 37℃ 浸泡 12 小时，然后高温灭菌。所需试剂为新配制，操作过程中尽量减少 RNA 酶的污染。采用热酚法提取 Xoo PXO99<sup>A</sup> 总 RNA 作为 cDNA 文库构建的起始 RNA（图 3-4）。由图可知，提取的 RNA 完整性很好，可以用于 cDNA 的合成。由于细菌对外界环境变化的感应敏感性很高，所以在设计实验重复时，要保证每次重复时细菌的培养条件是相同的，这样才能尽量减少由于实验操作上带来的误差。

在提取细菌总 RNA 的过程中，很难避免细菌基因组 DNA 的污染，为了减少基因组 DNA 对后续 cDNA 合成的影响，必须用无 RNA 酶的 DNA 酶处理提取的 RNA 样品，除去样品中的 DNA，这样才能保证反转录合成的 cDNA 真实地反映了细菌基因表达的情况。

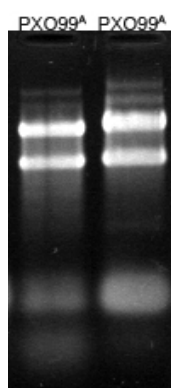


图 3-4 PXO99<sup>A</sup> 总 RNA

Fig.3-4. The total RNA of PXO99<sup>A</sup>

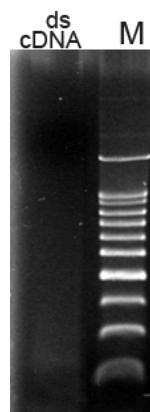


图 3-5 双链 cDNA 合成

Fig.3-5. ds cDNA synthesization

M, 200 bp ladder

### 3.3.3 合成和纯化双链 cDNA

细菌 mRNA 3'端不具有 poly (A) 尾巴，因此以随机六聚体核苷酸为引物，反转录合成第一链 cDNA，双链 cDNA 的合成采用试剂盒提供的引物 5'PCR primer 和 3'PCR primer。CHROMA SPIN 柱子纯化双链 cDNA，电泳检测纯化产物长度分布在 0.4-2.2 kb 之间，可以用于构建 cDNA 文库，共转化酵母，然而，从图上看双链 cDNA 的浓度较低（图 3-5），因此在共转化酵母时，我们适当的增加了双链 cDNA 的量。

### 3.3.4 诱饵载体 pGBKT7-*gacA<sub>Xoo</sub>* 和 Xoo 捕获文库的互作分析

在诱饵载体 pGBKT7-*gacA<sub>Xoo</sub>* 与捕获文库进行互作分析之前，检测 *gacA<sub>Xoo</sub>* 的自激活活性和毒性，发现 *gacA<sub>Xoo</sub>* 不具有自激活活性，对酵母细胞无毒性，可以作为诱饵蛋白，用于双杂交系统筛选与其互作的蛋白。

pGBKT7-*gacA<sub>Xoo</sub>* 和 Xoo 捕获文库共转化酵母感受态细胞，转化液铺于 SD/His-Leu-Trp 三缺培



培养基上, 在 2-3 天后, 有些菌落将显现出来, 但平板至少需要培养 5 天, 使生长较慢的菌落也显现出来, 有些小而苍白的菌落在培养 2 天后就出现了, 但直径不会超过 1 mm。真正的 Ade<sup>+</sup>His<sup>+</sup>克隆生长旺盛, 也能长到大于 2 mm。另外 Ade<sup>+</sup>菌落是白色的或呈淡粉色, 而 Ade<sup>-</sup>菌落在限制 adenine 的培养基中将慢慢变红。5 天后将三缺培养基上生长的直径大于 2 mm 的菌落接种到 SD/Ade-His-Leu-Trp-四缺培养基上。

在四缺平板上共筛选到 150 个克隆。通过 PCR 方法鉴定 150 个阳性克隆, 结果显示仅有五个克隆的插入片段在 400-800 bp 之间, 插入片段小于 200 bp (图 3-6) 的克隆被认为是假阳性克隆而舍弃。同时将 PCR 检测为阳性克隆的菌落接种到 SD/Ade-His-Leu-Trp-X- $\alpha$ -Gal 四缺培养基, 通过 *lacZ* 报告基因继续筛选阳性克隆 (图 3-7), 五个菌落均变蓝, 但是显示蓝色程度不同。

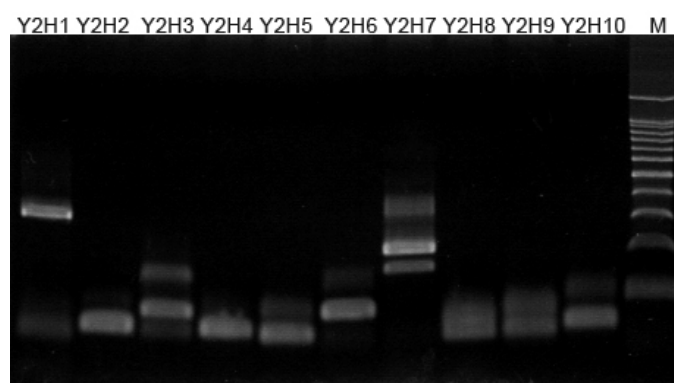


图 3-6 PCR 分析酵母双杂交阳性克隆 (部分)

Fig.3-6 The PCR analysis of positive clones acquired using Y2H (part)

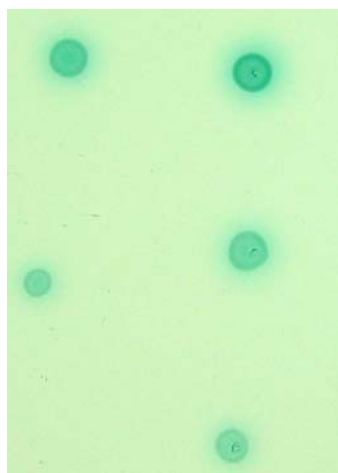


图 3-7 *lacZ* 报告基因筛选酵母双杂交阳性克隆

Fig.3-7. Screening the positive clones using *lacZ* gene

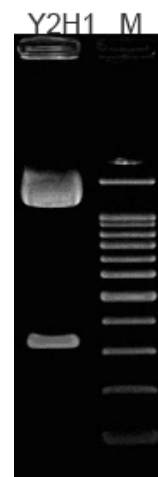


图 3-8 Y2H1 酶切分析

Fig.3-8. The restriction digestion of Y2H1

M. 200 bp ladder

利用超声波破碎酵母细胞壁, 从五个阳性克隆中提取质粒, 电转化 *E. coli*, 在含氨苄青霉素抗性的平板筛选插入捕获文库 cDNA 片段的质粒 pGADT7, 得到一个阳性克隆 Y2H1。对该克隆再次进行 PCR 分析, 回收 PCR 产物连接到 pMD18-T, 酶切分析结果如图 3-8。

将 Y2H1 质粒送 Invitrogen 公司测序分析, 插入片段长度为 571 bp, 由于 PCR 检测酵母双杂交阳性克隆使用的引物是 5'LD primer 和 3'LD primer 引物, 该对引物的扩增产物不但包括插入片段还含有 pGADT7 载体一部分序列, 约 100 bp 左右, 所以 Y2H1 酶切分析插入片段为 700 bp 左右 (如图 3-8)。

登录 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 输入 Y2H1 插入片段序列, 进行 BLAST 搜索, 发现该片段具有 TonB-Dependent-Receptor 结构域, 同时在 Xoo 全基因组序列中搜索到含有该插入片段的开放阅读框 XOO1805, 命名 XOO1805 为 *tdrxoo* 基因。

### 3.3.5 GacA<sub>xoo</sub> 与 Tdrxoo 互作的再验证

为了避免载体因素造成的假阳性, 将已得到初步验证的蛋白互作进行载体互换, 即原来在 pGADT7 上的 cDNA 插入片段换成 *gacA<sub>xoo</sub>*, 原来在 pGBKT7 载体上的 *gacA<sub>xoo</sub>* 换成 *tdrxoo* 的 cDNA 插入片段。将互换载体后的诱饵载体和捕获载体共转化酵母仍表现为互作, *lacZ* 基因表达验证结果如图 3-9。

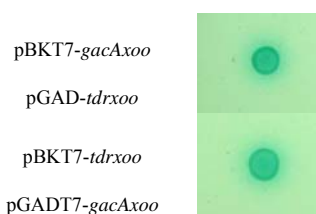


图 3-9 GacA<sub>xoo</sub> 与 Tdrxoo 互作的 *lacZ* 基因再验证

Fig.3-9. Reverification interactions between *gacA<sub>xoo</sub>* and *tdrxoo* segment with *lacZ* report gene

## 3.4 讨论

Y2H 是在真核模式生物酵母中进行的, 研究活细胞内蛋白质相互作用, 对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测得到, 它是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术。作为发现和研究在活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术平台, Y2H 在哺乳动物基因组和高等植物基因组编码的蛋白质之间的互作方面得到了广泛的应用。

在分子植物病理学方面, Y2H 也得到了广泛应用, 不仅验证了 Pto 与 AvrPto 之间的互作 (Tang *et al.*, 1996b), 而且通过 Y2H 筛选 Xac 基因组文库, 发现 RpfC 分别与 RpfG、RpfF、QS 相关调节因子和 NtrB/NtrC 类双组分调控系统发生作用, 同时发现 RpfG 的磷酸二酯酶结构域 (HD-GYP) 与二鸟苷环化酶结构域 GGDEF 互作, 携带 GGDEF 的蛋白可以产生环化二鸟苷酸 (cyclic diGMP), 作为重要的第二信使分子参与 Xac 复杂的生理生化过程, 包括毒性, 生物被膜形成和运动性 (Andrade *et al.*, 2006)。

Y2H 对植物病原细菌的 II 型、III 型和 IV 型分泌系统的各自组成蛋白之间及其底物蛋白之间的相互作用研究的也极为详尽 (Douet *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2004, 2005)。最近, 通过 Y2H 鉴定到了柑橘溃疡病菌 *X. axonopodis* pv. *citri* 基因组中 XAC1990 为分泌伴侣基因 *flgN*, FlgN 与鞭毛蛋白 FlgK 和 FlgL 互作, 在鞭毛的正确组装过程中具有重要作用 (Khater *et al.*, 2007)。

本研究采用了 CLONTECH 公司于 2001 年推出的 MATCHMARKER library Construction & Screening kit, 相对于以前的系统, 新系统做出了改进: 将 cDNA 文库的构建与筛选结合到了一起, 简化了操作步骤, 缩短了实验操作时间; 同时增加了检测双杂交阳性克隆的报告基因, 降低了筛选过程中的假阳性率。

某些诱饵蛋白质在酵母中大量表达时可能对酵母产生一定的毒性作用, 如使酵母体内的信号传导通路阻断, 干扰酵母中正常基因的表达调控, 抑制酵母细胞的分裂, 甚至使酵母细胞在选择培养基上不能生长等, 由此使得对某些种类的蛋白质不能在该系统中进行分析; 另外, 本身就有转录激活活性的蛋白质, 如 RNA 聚合酶 II 转录激活因子, 会直接激活报告基因而不需要两种蛋白质相互作用, 导致假阳性产生, 因此不能用来作为诱饵蛋白。本研究在构建诱饵载体时对 *gacA<sub>Xoo</sub>* 进行了检测, 发现 GacA<sub>Xoo</sub> 不具有自激活活性, 对酵母菌无毒性作用, 因此可以用作诱饵, 钓取与其发生互作的蛋白。

在 Y2H 中, RNA 质量的好坏直接关系到双杂交实验的成败。本研究采用实验室保存的成熟的细菌总 RNA 提取方法, 对实验过程中所用到的器皿、药品和试剂进行严格地处理, 获得了高质量的 Xoo 总 RNA, 为双杂交实验的成功打下了良好的基础。因为细菌 mRNA 不具有 poly (A) 尾巴, 所以采用随机六聚体作为反转录引物合成 cDNA, 得到的双链 cDNA 大小分布在 0.4-2.2 kb 之间, 可以用于下一步实验。但是实验中获得的双链 cDNA 浓度较低, 分析原因可能是试剂盒为了后期筛选的方便, 在随机六聚体引物的 5'端引入了 27 bp 的核苷酸序列, 因此降低了反转录的效率, 导致合成 cDNA 的浓度降低。为了弥补这一不足, 在后期的诱饵载体与双链 cDNA 共转化酵母感受态细胞时, 适当增加 cDNA 的用量。

将 pGBKT7-*gacA<sub>Xoo</sub>*、pGADT7-Rec 和双链 cDNA 三者共转化酵母感受态细胞, 转化液分为两个部分: 一部分转化液涂布在 SD/Leu-和 SD/Leu-Trp-平板上, 用于测试转化效率。其中在 SD/Leu-培养基上菌落数达到了  $1.8 \times 10^6$ , 在 SD/Leu-Trp-培养基上菌落数达到了  $4.5 \times 10^5$ , 基本符合 Y2H 的筛选要求。剩余转化液涂布于 SD/His-Leu-Trp-三缺平板上, 筛选与 GacA<sub>Xoo</sub> 互作的阳性克隆。经过三缺和四缺培养基的筛选, 获得了 150 个克隆, 为了减少工作量和节省 X- $\alpha$ -Gal 的用量, 并没有直接提取 150 个克隆的质粒, 而是采用 PCR 方法对获得的 150 个克隆进行了鉴定, 其中 5 个克隆的插入片段大于 400 bp。由于 X- $\alpha$ -Gal 极其昂贵, 因此选择将其涂布于四缺培养基而不是直接加入培养基中, 5 个 PCR 鉴定的克隆划线于四缺/X- $\alpha$ -Gal 培养基, 培养 3 天后菌落均显蓝色, 但显现蓝色程度不一致, 可能是 X- $\alpha$ -Gal 涂布的不均匀或者浓度太低或者诱饵蛋白与捕获蛋白结合的能力不同。从酵母中提取 5 个克隆所含质粒, 转化 *E. coli*, 仅获得一个转化子 Y2H1。从酵母提取的质粒 DNA 含有两种质粒, 可能是质粒的不兼容性造成了转化效率的降低。测序分析 Y2H1 含有长度为 571 bp 的 cDNA 插入片段, 搜索 Xoo 全基因组序列, 该片段包含在 XOO1805 ORF 中, 具有 TonB-Dep-Rec 结构域, 命名 XOO1805 为 *tdrxoo* 基因。

TonB-Dep-Rec 家族蛋白参与细菌多种分子透过外膜的过程, 如铁离子吸收。一般认为, 革兰氏阴性细菌外膜与周质间无任何能量来源, 推测分子透过外膜所需能量可能主要来自内膜的原动力或细胞质内的 ATP (Braun *et al.*, 1995)。Tdr 蛋白行使能量传递的功能, 提供外膜铁离子接受蛋白向胞内输送铁离子过程中的能量。因此, 该途径的基因突变将影响铁离子转运系统, 影响细菌生长。然而, 青枯菌 *prhA* 编码的 Tdr 蛋白并不参与铁离子转运, 却是其致病性和 III 型分泌系统

(TTSS) 的主控因子之一 (Marench M *et al.*, 1998)。Tdrxoo 蛋白在水稻白叶枯病菌 Xoo 中的作用至今尚不清楚。

为了避免载体干扰造成的假阳性, 将初步验证发生互作的 GacA<sub>Xoo</sub> 和 *tdrxoo* 编码 TDR 结构域的片段进行载体互换, 经过 *lacZ* 基因再验证, 二者仍表现为互作。但是 GacA<sub>Xoo</sub> 与完整的 Tdrxoo 蛋白之间的互作未得到验证, 推测原因可能是由于 *tdrxo* 全长为 2910 bp, 编码 969 个氨基酸, 合成的 Tdrxoo 分子量较大, 在酵母中表达时, 造成 Tdrxoo 的空间挤压, 影响了 GacA<sub>Xoo</sub>/Tdrxoo 之间的彼此靠近, 或者全长的 Tdrxoo 在空间的折叠妨碍了二者之间功能结构域的结合, 导致互作信号减弱, 双杂交系统检测不到。下一步应采用 pull-down 技术或免疫共沉淀法体外验证 GacA<sub>Xoo</sub> 与 Tdrxoo 之间的作用, 以确认二者的体外互作。

## 第四章 水稻白叶枯病菌 *tdrxoo* 基因的功能分析

白叶枯病是水稻生产上的三大病害之一，由黄单胞菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)引起，最早于 1884 年在日本福岗地区发现。近几十年来，由于有机肥料在水稻生产上的大量使用，水稻白叶枯病已成为东南亚等水稻主产区水稻生产上的主要病害。在澳大利亚、非洲、拉丁美洲、北美洲水稻生产区的发生也很严重 (Ryba-White *et al.*, 1995)。

水稻黄单胞菌是研究植物—病原物互作的一种重要模式菌 (David *et al.*, 2006)，Xoo 致病基因与其寄主水稻的抗病基因互作模式严格遵循“基因对基因假说”(Daniels and Leach, 1993)。在 Xoo 的致病性研究上，通过分离和研究致病相关突变体，许多毒性基因已被分离，如与胞外多糖 (EPS) 合成有关的 *gumG* 和 *gumM* (Dharmapuri and Sonti, 1999; Rajeshwari and Sonti, 2000)；调节 EPS 合成的 *rpfC* (Tang *et al.*, 1996a) 及离子代谢的 *rpfF* (Chatterjee and Sonti, 2002)；编码 III 型分泌系统结构蛋白及其效应子的 *hrp* 和 *avr* (Kamdar *et al.*, 1993; Bai *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000; Hopkins *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 2001)。编码 II 型分泌系统的结构蛋白基因 *xpsD* 和 *xpsF*，及一个与动物致病菌的非菌毛粘附物同源基因 *xadA* 的突变都使 Xoo 的致病性明显降低 (Ray *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2002)。另外，一种氨基酸营养缺陷型突变体也影响其致病性 (Goel *et al.*, 2001)。所有这些研究促进了我们对 Xoo 致病机制的理解。然而 Xoo 的致病过程很复杂，尚有很多致病因子未被发现。

因为水稻白叶枯病菌的寄主水稻为单子叶植物，而黄单胞属其它种病菌的寄主为双子叶植物，二者在分类上明显不同，所以 Xoo 基因组 (AE013598) 必定含有一些特异的基因决定了其与水稻的互作。将整个基因组与已报道的 Xac (AE008923) 和 Xcc (AE008922) 基因组序列进行比较，发现了 Xoo 包含 245 个所特有的基因，它们在 Xac 和 Xcc 中都不存在。其中 95 个基因编码功能性蛋白，150 个是未知功能的 (Lee *et al.*, 2005)。Xoo 中特有基因的功能涉及限制-修饰 (restriction-modification, RM)、TonB 依赖型铁载体受体、毒素产生 (mlrB、Rtx)、TTSS 效应蛋白和噬菌体相关蛋白。而且在 Xoo 中 *rax* 是特异的，与 I 型分泌和激发水稻抗性蛋白 XA21 所需的硫化作用有关 (da Silva *et al.*, 2004)。

研究一个基因的功能，最直接的方法是干扰这个基因的表达，研究其引起的表型变化。本研究对通过酵母双杂交获得的具有 TonB-Dep-Rec 结构域的 *tdrxoo* 基因进行突变分析，实验结果表明，与野生型菌株相比，*tdrxoo* 突变体对水稻致病性完全丧失，胞外纤维素酶和木聚糖酶活性、胞外多糖产生和生物被膜形成均明显减弱，但铁离子的运输却未受影响。对 *tdrxoo* 突变体进行功能互补分析，可以恢复到与野生型菌株相同的表型。

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 菌株和质粒

实验用菌株和质粒以及抗生素用量参见 2.1.1。质粒 pK18mob 为中国科学院微生物研究所植物基因组学重点实验室惠赠，该质粒不能在 Xoo 中复制。

### 4.1.2 生化试剂

pMD18-T Vector kit 购自 TaKaRa (大连) 公司, 其余药品和试剂参见 2.1.2

### 4.1.3 培养基和菌株培养条件

LB 培养基、M210 培养基和 PSA 培养基参见 2.1.3

XOM2 培养基:

EDTA-FeNa	0.101 g/L
(D) +Xylose	1.8 g/L
谷氨酸钠	1.87 g/L
L-Met	0.99 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L
MnSO <sub>4</sub>	0.006 g/L
MgCl <sub>2</sub>	1.017 g/L

调 pH 至 6.5-6.8, 过滤灭菌。固体培养基加 1.5%琼脂。

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 $\Delta tdrxoo$ 突变体质粒制备

设计引物 *tdrF*: 5'-TGGGCAGCTTGTAGTTCACGCCAA-3'和 *tdrR*: 5'-CCATTATGGCCGGG GGGACTACTGG-3', 以酵母双杂交菌落 Y2H1 质粒 DNA 为模板, 扩增含有 TonB-Dep-Rec 结构域的片段。将该片段连接 pMD18-T 载体, 转化 *E. coli* 感受态细胞, 提取重组子质粒, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切分析质粒 DNA, 回收酶切片段, 与经过相同内切酶处理的 pK18mob 载体连接, 转化 *E. coli* 感受态细胞。选取阳性克隆提取重组子质粒 DNA, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切分析验证。构建好的 *tdrxoo* 突变体质粒 DNA 于-20℃长期保存。

### 4.2.2 $\Delta tdrxoo$ 基因突变体构建

PXO99<sup>A</sup>电击感受态细胞制备参见 2.2.4。将 4.2.1 中构建好的 *tdrxoo* 突变体质粒, 电击法导入 PXO99<sup>A</sup>电击感受态细胞中, 转化液铺于含卡那霉素抗性的PSA平板, 28℃培养 3-5 天; 将阳性转化子菌落重新转接于一个新的含卡那霉素抗性的PSA平板, 转接三到四次; 然后将阳性菌落接种含卡那霉素抗性的M210 液体培养基, 28℃ 200 rpm振荡培养 48 小时, 接种针蘸取少量菌液划线于含卡那霉素抗性的PSA平板, 28℃培养 48-72 小时; 挑取阳性单克隆接种含卡那霉素抗性的M210 液体培养基, 28℃ 200 rpm振荡培养 48 小时, 保存 *tdrxoo* 突变体菌种于-70℃, 保存方法参见 2.1.3。PCR 设计 PCR 引物 *tdrxooF*: 5'-ATCACTGATTTTATTAAATTACTG-3' 和 *tdrxooR*: 5'-GCTGACGTGGTGAGATCGAACGCG-3', 分析验证 *tdrxoo* 突变体  $\Delta tdrxoo$ 。

### 4.2.3 $\Delta tdrxoo$ 突变体的互补菌株构建

采用引物 *tdrxooF* 和 *tdrxooR* 扩增含自身启动子的 *tdrxoo*，克隆到 pMD18-T 载体上，测序鉴定后，用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切回收约 3.2 kb 的片断，与同样经双酶切的 pHM1 载体相连接，转化 *E. coli* 感受态细胞 DH5 $\alpha$ ，提取阳性克隆中的质粒，将其转入 *tdrxoo* 突变体中，含壮观霉素抗性和卡那霉素抗性 PSA 平板筛选阳性转化子，所得转化子即为其互补菌株  $\Delta tdrxoo::C$ 。

### 4.2.4 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 双基因突变菌株构建

$\Delta gacA_{xoo}$  突变体电击感受态细胞制备参见 2.2.4。将 4.2.2 中构建好的  $\Delta tdrxoo$  突变体质粒，电击法导入  $\Delta gacA_{xoo}$  电击感受态细胞中，转化液铺于含庆大霉素和卡那霉素抗性的 PSA 平板，28℃ 培养 3-7 天；将阳性转化子菌落重新转接于一个新的含庆大霉素和卡那霉素抗性的 PSA 平板，转接三到四次；然后将阳性菌落接种含庆大霉素和卡那霉素抗性的 M210 液体培养基，28℃ 200 rpm 振荡培养 48 小时，接种针蘸取少量菌液划线于含庆大霉素和卡那霉素抗性的 PSA 平板，28℃ 培养 48-72 小时；挑取阳性单克隆接种于含庆大霉素和卡那霉素抗性的 M210 液体培养基，28℃ 200 rpm 振荡培养 48 小时，保存  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$  菌种于 -70℃，保存方法参见 2.1.3。采用引物 *tdrxooF* 和 *tdrxooR* PCR 分析验证  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$  双突变体。

### 4.2.5 致病性和 HR 反应测定

将待测菌株在 28℃ 条件下振荡培养至  $10^8$  CFU/ml 以上，离心收集菌体，无菌水稀释菌液至 OD<sub>600</sub>=0.5。用剪叶法将稀释好的各个菌种均匀接种到生长期为 40 天的感病水稻品种 IR24 的二、三心叶上，每个菌株接种叶片 15 张。温室温度控制在 25-35℃，湿度达到 90% 左右，以利于 Xoo 的发病，接种后 12 天和 20 天调查白叶枯病的发病情况，详细记录其病斑长度，取其中有代表性的 3 片发病叶片，测量其病斑长度，重复接种一次，取 6 次测量的均值作图。同时将相同浓度的菌液直接注射烟草叶片，接种 24-48 小时后观察烟草叶片接种部位有无 HR 产生。

### 4.2.6 运动性测定

$\Delta tdrxoo$  和  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$  菌株运动性分析方法参见 2.2.9。

### 4.2.7 胞外多糖分泌检测

胞外多糖是根据菌落在 PSA 固体培养基上的生长形态来检测。将待测菌株接种在含有 2% (w/v) 葡萄糖的 PSA 固体平板上，28℃ 培养 48 小时后，移至室温（约 20-25℃）放置 3 天，测量菌落的直径，观察野生型与突变体胞外多糖产生情况。能产生胞外多糖的菌株在菌落表面产生大量粘液，菌落湿润而大，不能产生胞外多糖的菌株菌落干燥而小。

### 4.2.8 胞外酶类活性测定

$\Delta tdrxoo$  和  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$  菌株胞外酶类活性分析方法参见 2.2.10。

#### 4.2.9 生长曲线测定

将待测菌株 28℃ 振荡培养 48 小时后，用新鲜的 M210 或 XOM2 培养基将各菌稀释至  $OD_{600}=0.5$ ，以 1: 1000 (v: v) 的比例将各个相同浓度的菌种接种于 100 ml 的 M210 或 XOM2 培养基中，28℃ 条件下 200 rpm 培养，每隔 6 小时同时测定各菌株在 600 nm 的吸光值。

#### 4.2.10 嗜铁素 (siderophore) 产生的检测

嗜铁素检测培养基 (CAS-PSA) 制作参照 Schwyn 和 Neilands (1987) 方法：取 0.012 g 铬天青 S (CAS) 溶于 10 ml ddH<sub>2</sub>O 中，并与 2 ml 1 mM FeCl<sub>3</sub> 溶液混匀配制为溶液 A；取 0.015 g 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 溶于 8 ml ddH<sub>2</sub>O 中配制溶液 B；将溶液 A 缓慢加入到溶液 B 中，充分混匀即为 CAS 染液。

将待测菌用牙签蘸取少许菌液点接于含 1% CAS 染液的 PSA 平板上。28℃ 培养 48 小时后，由于嗜铁素竞争培养基中 EDTA 螯合的铁离子，使培养基由蓝色变成黄色，观察菌落黄色晕圈的出现或者大小判断菌株间嗜铁素产量的差异。每个处理设 3 个重复。

#### 4.2.11 $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacAxoo/\Delta tdrxoo$ 鞭毛电镜观察

将新鲜培养的待测菌株送至中国农业科学院农产品加工研究所电镜室观察各个菌株的鞭毛产生情况。

#### 4.2.12 生物被膜 (Biofilm) 的定性检测

将待测菌株用 M210 液体培养基培养至饱和，按 1:1000 的比例用新鲜的 LB 稀释。取 0.5 ml 转移到新的 1.5 ml 离心管中，28℃ 培养（避免振动），每个处理 3 个重复。培养 24 小时后，加入 100  $\mu$ l 0.1% (w/v) 的结晶紫溶液室温染色 15 分钟，然后用蒸馏水冲洗试管至冲洗液清晰。在菌液与空气交界面的位置，细菌形成坚固的附着膜附着于管壁，蒸馏水冲不掉则被结晶紫染色，呈现一个紫色环状带。

#### 4.2.13 *tdrxoo* 基因的生物信息学分析

对 *tdrxoo* 基因进行生物信息学分析，方法和软件参见 2.2.11

#### 4.2.14 革兰氏阴性细菌中 TDR 类基因分析

TDR 类蛋白具有两个保守结构域，分别是位于 N 端的 plug 结构域 (PF07715) 和位于 C 端的 TonB-Dep-Rec 结构域 (PF00593)。以这两个结构域为基础，登录 Pfam 数据库 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) 搜索 226 种革兰氏阴性细菌全基因组氨基酸序列。统计分析 TDR 类蛋白在革兰氏阴性菌中的分布情况。



4.3 结果与分析

4.3.1  $\Delta tdrxoo$  的制备

酵母双杂交实验获得的 cDNA 片段含有 TonB-Dep-Rec 结构域，长度为 571 bp，连接此片段到 pK18mob 载体（图 4-1），构建 *tdrxoo* 突变体质粒，命名为 pKtdr。*EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切分析，cDNA 片段正确插入 pK18mob 载体（图 4-2）。

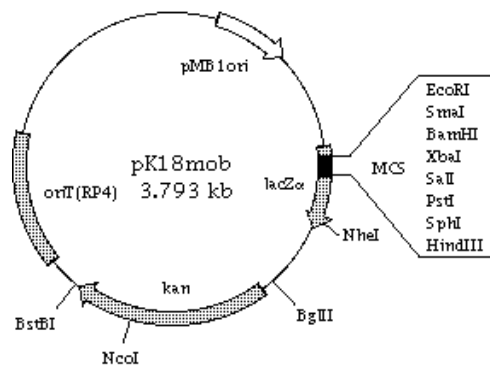


图 4-1 pK18mob 载体图

Fig.4-1. pK18mob vector

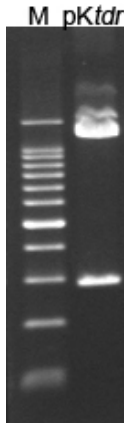


图 4-2 pKtdr 质粒 DNA 双酶切分析

Fig.4-2. The restriction analysis of pKtdr by *EcoR* I and *Hind* III  
M. 200bp ladder

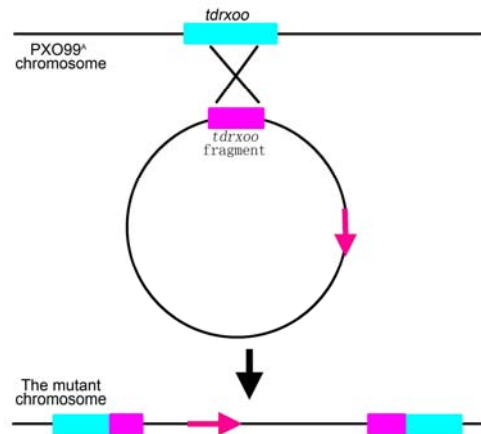


图 4-3 同源重组单交换突变 *tdrxoo*

Fig.4-3. Model of construction *tdrxoo* mutant by a single  
corss-over recombination

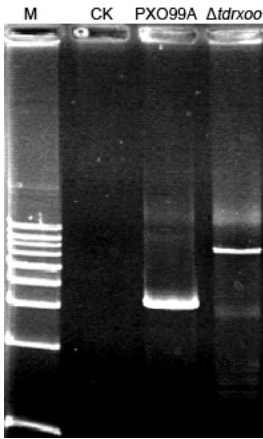


图 4-4 PCR 分析 *tdrxoo* 野生型和突变体

Fig.4-4. PCR analysis of PXO99<sup>A</sup> and  $\Delta tdrxoo$   
M. 1 kp ladder CK. ddH<sub>2</sub>O

将构建好的pKtdr质粒DNA电击导入PXO99<sup>A</sup>感受态细胞中，当质粒导入细菌细胞后，因为pKtdr中含有的cDNA片段为PXO99<sup>A</sup>基因组中*tdrxoo*的一部分，所以二者发生同源重组，质粒将整合到PXO99<sup>A</sup>基因组中，造成*tdrxoo*的断裂，达到突变该基因的目的（图 4-3）。以野生型PXO99<sup>A</sup>和*tdrxoo*突变体基因组DNA为模板，采用引物*tdrxoo*F和*tdrxoo*R通过PCR分析验证*tdrxoo*突变体，因

为引物 *tdrxooF*/*tdrxooR* 位于 *tdrxoo* 基因相邻的 5' 端和 3' 端, 在野生型中的扩增产物是 3.2 kb, *tdrxoo* 突变体中由于 pK18mob 的插入到 *tdrxoo* 基因中, 因此其扩增产物为 7.2 kb (图 4-4), 证明已经获得 *tdrxoo* 基因突变体。

### 4.3.2 $\Delta tdrxoo$ 互补菌株的制备

引物 *tdrxooF* 和 *tdrxooR* 位于 *tdrxoo* 基因相邻的 5' 端和 3' 端, 可以扩增包含 *tdrxoo* 基因及其自身启动子的序列, 扩增产物连接于 pMD18-T, 对重组子进行测序分析, 验证重组子中 *tdrxoo* 的读码框是否正确。 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切重组子, 回收酶切产物连接于同样经过双酶切处理的 pHM1 载体, 转化 *E. coli* 感受态细胞, 提取重组子质粒 DNA, 命名为 pH*tdrxoo*, *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切分析, *tdrxoo* 片段正确插入 pHM1 载体 (图 4-5)。将 pH*tdrxoo* 电击导入  $\Delta tdrxoo$  感受态细胞, 在含壮观霉素抗性和卡那霉素抗性 PSA 平板筛选阳性转化子, 所得转化子即为其互补菌株, 命名为  $\Delta tdrxoo::C$ 。从互补菌株中提取质粒, *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切分析, 证明互补菌株含有 pH*tdrxoo* 质粒 (图 4-6)。

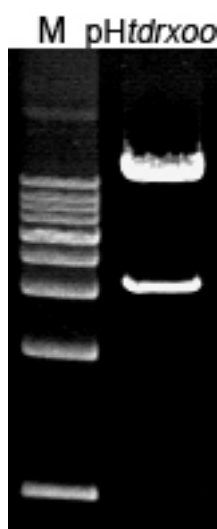


图 4-5 pH*tdrxoo* 双酶切分析

Fig.4-5. The restriction analysis of pH*tdrxoo* in  $\Delta tdrxoo$  by *Kpn* I and *Hind* III  
M. 1 kp ladder

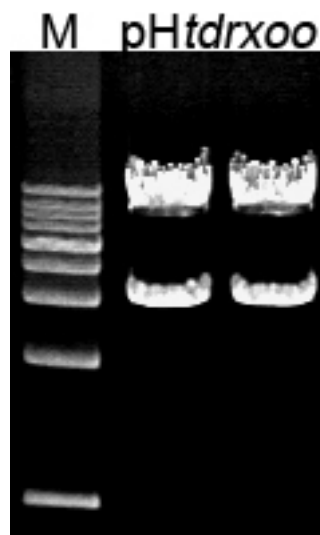


图 4-6 互补菌株中 pH*tdrxoo* 双酶切分析

Fig.4-6. The retrsiction analysis of pH*tdrxoo* in  $\Delta tdrxoo::C$  by *Kpn* I and *Hind* III  
M. 1 kp ladder

### 4.3.3 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 双基因突变菌株的构建

将 pKtdr 质粒 DNA 电击导入到  $\Delta gacA_{xoo}$  中, 含庆大霉素和卡那霉素抗性的 PSA 平板筛选转化子, 转化子经多次转接培养, 具有稳定的庆大霉素和卡那霉素抗性菌株为双突变菌株, 命名为  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 。采用庆大霉素抗性基因 *Gm* 引物 *GmF*/*GmR* 和 *tdrxoo* 基因引物 *tdrxooF*/*tdrxooR* 检测野生型菌株 PXO99<sup>A</sup> 和双突变菌株。在 PXO99<sup>A</sup> 中无 *Gm* 扩增产物, 而  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$  中扩增 *Gm* 基因, 大小为 850 bp 左右 (图 4-7); *tdrxooF*/*tdrxooR* 引物扩增结果显示在 PXO99<sup>A</sup> 中具有 3.2 kb 左右的扩增条带, 而  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$  中扩增条带为 7.2 kb 左右 (图 4-8), 表明 pKtdr 质粒已经整

合到  $\Delta gacA_{xoo}$  基因组中, 获得了  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$  双基因突变体。

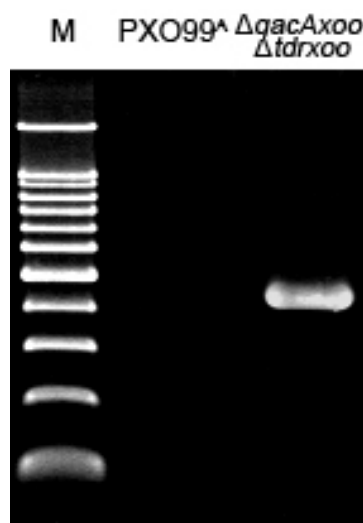


图 4-7 GmF/GmR 引物 PCR 检测  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$

Fig.4-7. PCR analysis of  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$  by the primers GmF/R  
M. 200 kb ladder

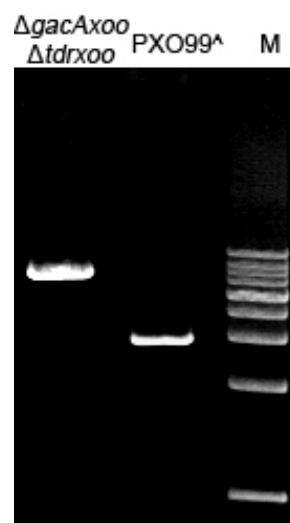


图 4-8 *tdrxooF/tdrxooR* 引物 PCR 检测  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$

Fig.4-8. PCR analysis of  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$  by the primers *tdrxooF/R*  
M. 1 kp ladder

#### 4.3.4 突变体致病性和 HR 反应分析

用剪叶法将稀释好的PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdr_{xoo}$ 、 $\Delta tdr_{xoo}::C$ 和  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$ 菌种均匀接种到生长期为 40 天的感病水稻品种IR24 的二、三心叶上, 致病性分析结果显示与野生型菌株PXO99<sup>A</sup>相比,  $\Delta tdr_{xoo}$ 和  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$ 丧失致病性, 在接种叶片上几乎看不到病斑的产生, *tdrxoo*单突变体的互补菌株  $\Delta tdr_{xoo}::C$ 致病性恢复至野生型水平 (图 4-9), 推测*tdrxoo*基因参与了Xoo致病过程的调控。



图 4-9 PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdr_{xoo}$ ,  $\Delta tdr_{xoo}::C$ 和  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$  菌株致病性分析

Fig.4-9. The pathogenicity analysis of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdr_{xoo}$ ,  $\Delta tdr_{xoo}::C$  and  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$



图 4-10 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdr_{xoo}$ 和  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$  菌株 HR 反应测试

Fig.4-10. HR test of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdr_{xoo}$  and  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdr_{xoo}$  on tobacco

将PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌种调至相同浓度，直接注射入烟草叶片，进行HR反应分析，结果显示四个菌株均引起烟草叶片的HR反应（图 4-10），说明 $tdrxoo$ 的突变可能并不影响 $hrp$ 基因的表达。

#### 4.3.5 胞外多糖分泌检测

新鲜培养的PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌液，划线培养于PSA固体平板，野生型PXO99<sup>A</sup>菌株和互补菌株 $\Delta tdrxoo::C$ 能产生胞外多糖，在菌落表面产生大量粘液，菌落湿润而大；而 $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌株菌落形状在PSA平板上表现为菌落小而蜜黄色，较干燥，可能是由于胞外多糖不能合成或不能有效分泌到胞外造成的。（图 4-11）。

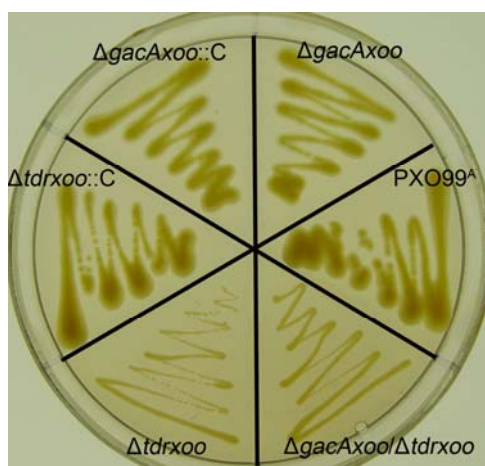


图 4-11 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 、 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 胞外多糖检测

Fig.4-11. The EPS production of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdrxoo$ ,  $\Delta tdrxoo::C$ ,  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$

#### 4.3.6 突变体菌株运动性分析和鞭毛的电镜观察

取浓度一致的PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌液 1  $\mu$ l接种于半固体培养基，28℃培养 4 天，观察各个菌株的运动轨迹。与野生型相比， $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 的运动能力明显减弱但仍具有运动性， $\Delta tdrxoo::C$ 运动能力恢复至野生型水平（图 4-12）。表明 $tdrxoo$ 影响了Xoo的运动性。电镜观察单突变菌株、双突变菌株和野生型菌株显示，三者均具有鞭毛（图 4-13）。

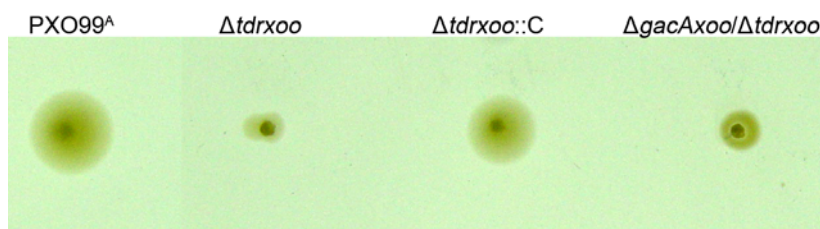


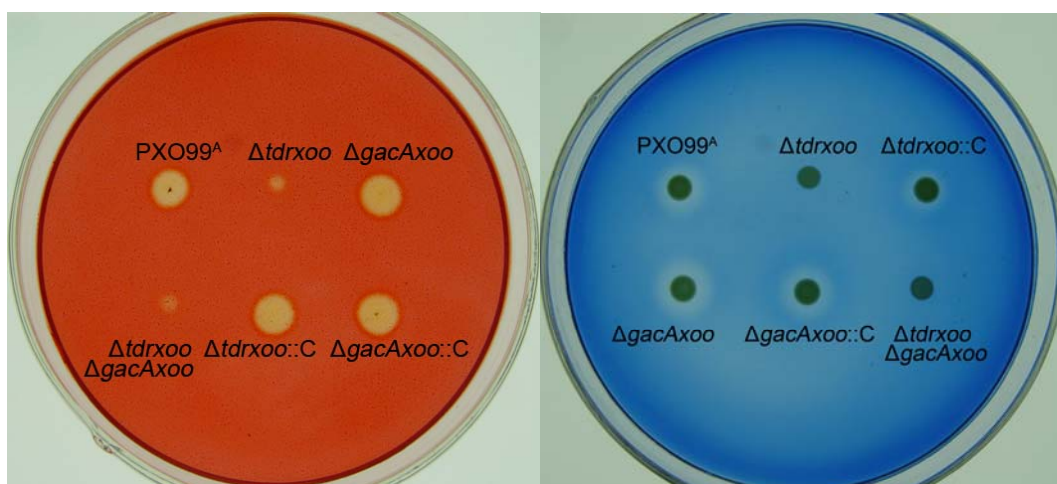
图 4-12 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌株运动性分析

Fig.4-12 Semisolid plate analysis of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdrxoo$ ,  $\Delta tdrxoo::C$  and  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$

图 4-13 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 菌株鞭毛的电镜观察Fig.4-13. Electron micrograph showing the flagellum of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdrxoo$  and  $\Delta tdrxoo::C$ 

### 4.3.7 突变体菌株胞外酶活性分析

新鲜培养的PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌液，调至浓度一致，各取1  $\mu$ l菌液点接于含0.2%RBB-xylan的PSA平板，检测胞外木聚糖酶活性；另取1  $\mu$ l点接于含0.5%羧甲基纤维素的PSA平板，检测胞外纤维素酶活性。与野生型相比， $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 纤维素酶和木聚糖酶活性明显减弱（图4-14），在 $\Delta tdrxoo::C$ 中两种酶的活性恢复至野生型水平，推测 $tdrxoo$ 可能参与了两种酶的产生或泌出过程的调控。

图 4-14 PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 、 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌株纤维素酶（左）和木聚糖酶（右）活性分析Fig.4-14. Agarose plate assays for cellulase (left) and xylanase (right) activities of PXO99<sup>A</sup>,  $\Delta tdrxoo$ ,  $\Delta tdrxoo::C$ ,  $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 

### 4.3.8 嗜铁素产生的检测

新鲜培养的PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌液，调至浓度一致，各取1  $\mu$ l菌液点接于CAS-PSA平板，28℃培养48小时后观察菌落周围黄色晕圈产生的大小，发现各个菌株的嗜铁素产生水平并无明显差异，表明虽然 $Tdrxoo$ 具有TonB-Dep-Rec结构域，但是该基因的表达与否与胞外铁离子的浓度无关（结果未显示）。

### 4.3.9 生长曲线的测定

接种统一浓度的PXO99<sup>A</sup>、 $\Delta tdrxoo$ 、 $\Delta tdrxoo::C$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌液至M210和XOM2



培养基, 28℃振荡培养, 每隔6小时测定各个菌株在600 nm的吸光值。在丰富培养基M210中,  $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌株的迟滞期比PXO99<sup>A</sup>晚12小时, 而且在静止生长期突变体菌株的最大菌浓度明显低于野生型, 互补菌株 $\Delta tdrxoo::C$ 则恢复至野生型水平(图4-15左)。

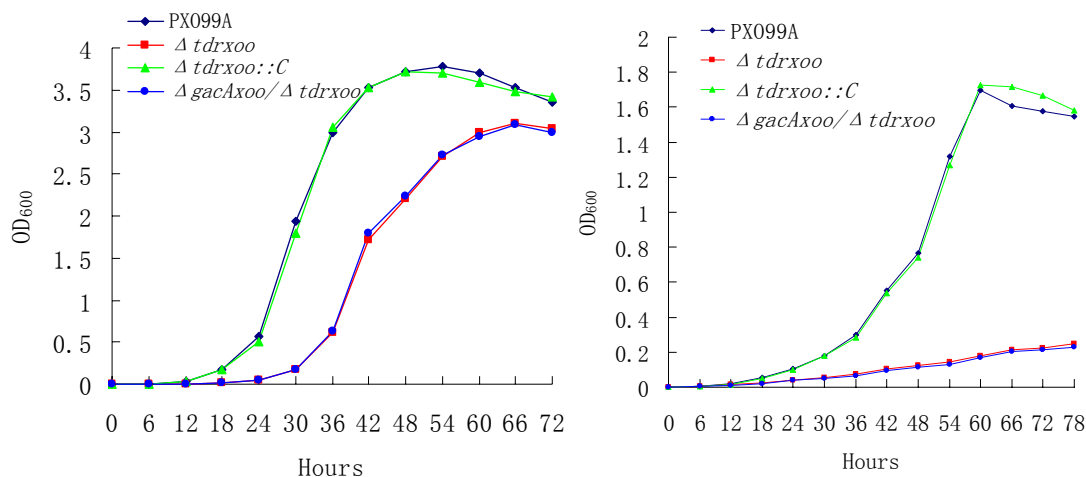


图 4-15 PXO99<sup>A</sup>及 $tdrxoo$ 突变体株系和互补株系在M210(左)和XOM2(右)培养基中生长曲线测定  
Fig.4-15. The growth curve of PXO99<sup>A</sup> and its  $tdrxoo$  derivatives in M210 (left) and XOM2 (right) medium

*hrp*基因的表达在丰富培养基中受到抑制, 而在基本培养基中受到诱导, 因此选择 $hrp$ 基因诱导培养基XOM2 模拟细菌在植物体内的环境。与PXO99<sup>A</sup>菌株相比,  $\Delta tdrxoo$ 和 $\Delta gacA_{xoo}/\Delta tdrxoo$ 菌株在XOM2 培养基中迟迟不能达到静止生长期(图4-15右), 生长受到严重抑制。

由此可见,  $tdrxoo$ 与Xoo的生长密切相关, 该基因的突变使得Xoo在丰富培养基M210和 $hrp$ 基因诱导培养基XOM2中的生长均受到影响。

#### 4.3.10 Biofilm 形成分析

Biofilm是在固体表面由微生物及其胞外多糖形成的一种类似于膜的坚固结构, biofilm内的细菌形成一个交互的群落而非自由的浮游细胞(Dennis, et al., 2003)。在实验中发现, 野生型菌株PXO99<sup>A</sup>形成biofilm的能力较弱, 当 $tdrxoo$ 突变后, 在离心管壁能明显观察到紫色环状biofilm的形成(图4-16), 功能互补 $tdrxoo$ 突变基因后, 互补菌株的biofilm形成能力减弱。表明 $tdrxoo$ 基因对Xoo的biofilm形成具有负调控作用。

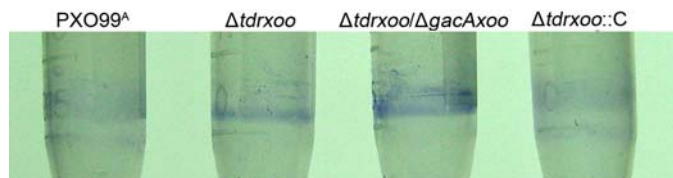


图 4-16 PXO99<sup>A</sup>及其 $tdrxoo$ 突变体和互补株系Biofilm形成分析  
Fig.4-16. Biofilm formation analysis of PXO99<sup>A</sup> and its  $tdrxoo$  derivatives

#### 4.3.11 $tdrxoo$ 基因的生物信息学分析

SMART 程序分析显示  $tdrxoo$  基因全长为 2910 bp, 编码 969 个氨基酸, 分子量为 103.3 kD,

等电点为 4.656。1-23 位氨基酸为信号肽，55-167 位氨基酸为 plug 结构域，608-969 位氨基酸为 TonB-Dep-Rec 结构域（图 4-17）。Tdrxoo 具有接受胞外信号的胞外环和可以进行跨膜的反向  $\beta$ -折叠桶。CDS 程序搜索保守结构域，发现 Tdrxoo 与离子通道配体蛋白、铁离子运输蛋白、TonB-Dep-Rec 蛋白和细菌外膜蛋白具有同源性（图 4-18）。推测其是位于细菌外膜的蛋白，可能接收来自细菌体外环境的信号。*tdrxoo* 基因在已经完成全基因组测序的 Xoo KACC10331 菌株中其功能注释为未知功能蛋白（hypothetical protein）。



图 4-17 Tdrxoo 氨基酸序列分析

红色为信号肽

Fig.4-17. The analysis of amino acid sequence of Tdrxoo using SMART programe. signal peptide (red)

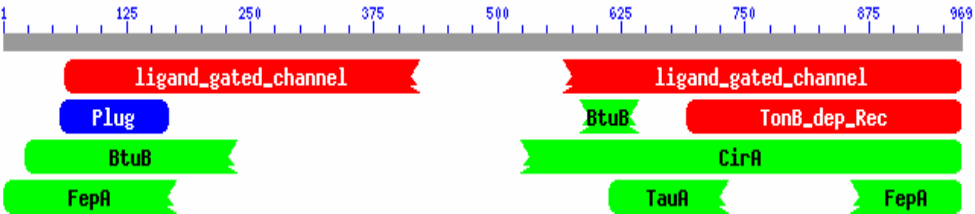


图 4-18 *tdrxoo* 同源性分析

Fig.4-18. Nucleic acid alignments of *tdrxoo* using BLAST

分析已完成全基因组序列测定的六个黄单胞属细菌的基因组序列，发现 *tdrxoo* 及其在其它黄单胞属细菌中的同源基因，在基因组中的位置具有高度保守性，*tdrxoo* 上游为热激蛋白基因和与内膜转运相关的基因，下游为 *terR* 类调控抑制子和水解酶相关基因（图 4-19）；氨基酸序列同源性比对表明 Tdrxoo 在黄单胞属细菌中为一保守蛋白（图 4-20）。

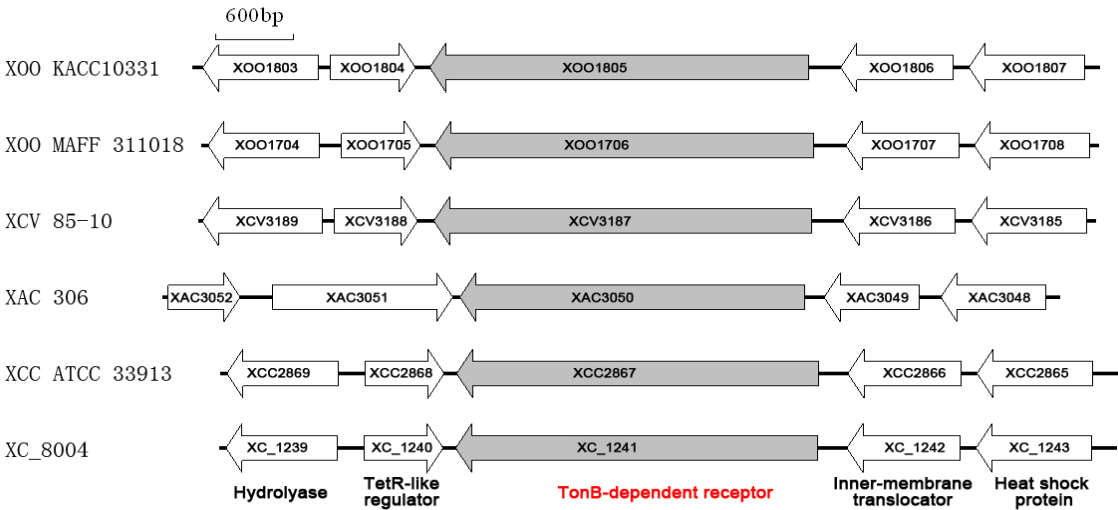


图 4-19 *tdrxoo* 基因在黄单胞属细菌基因组中位置分析

Fig.4-19. The genome organization of *tdrxoo* in completely sequenced *Xanthomonas* bacterial genomes

Tdrxoo_pro	.....HNPKSNKLRDAVVLAVLGGTGNVLSATAMACTKPADEAATLDAIMVTGSRISTPGLTSSPVTISIEREDFMRTPQVAAVEEFVKQLPSVS..PTV	93
XOO1706_pro	.....HNPKSNKLRDAVVLAVLGGTGNVLSATAMACTKPADEAATLDAIMVTGSRISTPGLTSSPVTISIEREDFMRTPQVAAVEEFVKQLPSVS..PTV	93
XCV3187_pro	.....HNPKSNKLRDAVVLAVLGGTGNVLSATAMACTKPADEAATLDAIMVTGSRISTPGLTSSPVTISIEREDFMRTPQVAAVEEFVKQLPSVS..PTV	86
XAC3050_pro	NDPLFSEPPAGKTTLGSQDHLERELHNPKSNKLRDAVVLAVLGGTGNVLSATAMACTKPADEAATLDAIMVTGSRISTPGLTSSPVTISIEREDFMRTPQVAAVEEFVKQLPSVS..PTV	113
XC_1241_pro	.....MERELHNPKSNKLRDAVVLAVLGGTGNVLSATAMACTKPADEAATLDAIMVTGSRISTPGLTSSPVTISIEREDFMRTPQVAAVEEFVKQLPSVS..PTV	92
XCC2867_pro	.....MERELHNPKSNKLRDAVVLAVLGGTGNVLSATAMACTKPADEAATLDAIMVTGSRISTPGLTSSPVTISIEREDFMRTPQVAAVEEFVKQLPSVS..PTV	92
Tdrxoo_pro	GPGTNNGATGAAE...LDLPLGSGNRTLVLVGGRRFPVPYD..LSGVVDNTNIPVALIQSVDLTGGAASVYTGADALISGVANFLLRRDFGQVEVQSSYGSKYDGCARQRIEATNGANSSDG	209
XOO1706_pro	GPGTNNGATGAAE...LDLPLGSGNRTLVLVGGRRFPVPYD..LSGVVDNTNIPVALIQSVDLTGGAASVYTGADALISGVANFLLRRDFGQVEVQSSYGSKYDGCARQRIEATNGANSSDG	209
XCV3187_pro	SRTSPLSGSENVGGYIDRLNGLGARTLVLVGGRRFLGITN..GGLQDVASIFAVHVERIEVLKDGASTIYGSDAIAGVWNTLRKDFGQVEVQSSYGSKYDGCARQRIEATNGANSSDG	204
XAC3050_pro	STYNNNGGNETR...VSLNGLGARTLVLVGGRRFVAGTGCGGATDNTIPTAIEERVEVLKDGASTIYGSDAIAGVWNTLRKDFGQVEVQSSYGSKYDGCARQRIEATNGANSSDG	228
XC_1241_pro	JRTFNNNGDSSG...IALNGLGARTLVLVGGRRFTTG...LDGSDVNTIPTANVERIDIKDGASTIYGSDAIAGVWNTLRKDFGQVEVQSSYGSKYDGCARQRIEATNGANSSDG	205
XCC2867_pro	JRTFNNNGDSSG...IALNGLGARTLVLVGGRRFTTG...LDGSDVNTIPTANVERIDIKDGASTIYGSDAIAGVWNTLRKDFGQVEVQSSYGSKYDGCARQRIEATNGANSSDG	205
Tdrxoo_pro	KGNVVSFGHTKVDPPFGQRAWGVK...RSSANGRPQSGGTTVPVSLVPGVGVGTGDD...GTLDRGQIDPTTGQIVS...DVQTHAFNPNINFLGTGLDRYQATLGRVEINE	318
XOO1706_pro	KGNVVSFGHTKVDPPFGQRAWGVK...RSSANGRPQSGGTTVPVSLVPGVGVGTGDD...GTLDRGQIDPTTGQIVS...DVQTHAFNPNINFLGTGLDRYQATLGRVEINE	318
XCV3187_pro	RGSLTAGVYINEDPWVARNPFSRAR..FPTGKTAAPRPGGLSGTTEGFRFAYTNATGGTSTR...TLRRDVAGLDPAFSSYRALNGTDSAPSLESTVYSGIRKSAFLNGHFDFTD	319
XAC3050_pro	RFRTLFGAAYVKEEPSAGREISAVPIYKTGTAFGTTSPNGRFALCNGTSPGACSGTQTRPNGTGQGYDAGSTPANWFWNGTGADVDVAFAPDNTLTPQBRKSFQGAQDFLTD	348
XC_1241_pro	RATLVNGASVYKEDSWMAGREISAG...GPPFFSGQSGTG...FPGSYVRNGSR...RILINGVETPVANVHG...YNTAPDNYLLTPQBRKSLFQGSFNTD	299
XCC2867_pro	RATLVNGASVYKEDSWMAGREISAG...GPPFFSGQSGTG...FPGSYVRNGSR...RILINGVETPVANVHG...YNTAPDNYLLTPQBRKSLFQGSFNTD	299
Tdrxoo_pro	HAAYQGVNTRSRVETSLPSGLFQ...EAFDMPIGNPLIPPEAR...QQLQAYGIDAANCVP...NATHIEGLTIGRRLTELGPTRDRFTKTFQVTLGLRGAITDNWK	422
XOO1706_pro	HAAYQGVNTRSRVETSLPSGLFQ...EAFDMPIGNPLIPPEAR...QQLQAYGIDAANCVP...NATHIEGLTIGRRLTELGPTRDRFTKTFQVTLGLRGAITDNWK	422
XCV3187_pro	VAFDTSVLITDRESFAQNGYPMQSAN...FDLSSGGLSIDSVFNPGLQAGTALPAGVAPQAVQVVRGWEVPREVQNNLTTSRFTGKFSG..NFNNGEYKWDUELQFLYNQNK...	430
XAC3050_pro	KVRFITQATNNRQSEQLLAMPVLTGTPGAGVQAVTQVTSISANSYNPFG...RDVSVRQVRAQETG...GRSFQAVDTPFGVGALEG..SFEVGGDYFSDWAGSYGRND...	453
XC_1241_pro	VWTFRTAMNWRKSEQLLAMPVLTG...LTLSDSLYNPFG...QNLTSVNRRIETG...GRSFQAVDTPFGVGALEG..SFEVGGDYFSDWAGSYGRND...	392
XCC2867_pro	VWTFRTAMNWRKSEQLLAMPVLTG...LTLSDSLYNPFG...QNLTSVNRRIETG...GRSFQAVDTPFGVGALEG..SFEVGGDYFSDWAGSYGRND...	392
Tdrxoo_pro	YDAFVSHESERLAESENNVLSKTRQALMSLDSTCVDPDSNG...CVPINLVG...PFGVSPEALKFINDLSAFSIOQVQDNAAALNVSGLGFGKSPWSEYPIGVNFAEHER	531
XOO1706_pro	YDAFVSHESERLAESENNVLSKTRQALMSLDSTCVDPDSNG...CVPINLVG...PFGVSPEALKFINDLSAFSIOQVQDNAAALNVSGLGFGKSPWSEYPIGVNFAEHER	531
XCV3187_pro	.CTQISTNLTNYAVQAQATPSFINSEG..VAQCTAAMPITLFGPGCATPMPPLFPFGVNAFNLNDPVMQAVLYOPQALSETTTHNYFASVSGILATLPAG...DLGLAVYMERRE	544
XAC3050_pro	.QNDTTTGLNVLALNALLPSFIDAGG.VARCTAASVITG...CVPINLVG...PFGVSPEALKFINDLSAFSIOQVQDNAAALNVSGLGFGKSPWSEYPIGVNFAEHER	555
XC_1241_pro	.ENVLTGLNLANLNNATPSELRLNGVPCVSPGGDVIPG...CVPINLVG...PFGVSPEALKFINDLSAFSIOQVQDNAAALNVSGLGFGKSPWSEYPIGVNFAEHER	495
XCC2867_pro	.ENVLTGLNLANLNNATPSELRLNGVPCVSPGGDVIPG...CVPINLVG...PFGVSPEALKFINDLSAFSIOQVQDNAAALNVSGLGFGKSPWSEYPIGVNFAEHER	495
Tdrxoo_pro	ATAGTRSDSGSIOQEVNMGAPTPDSGGFTINDAFGFIPLIDNPVYALSLAEGVRYTSFKTSSNTSDEYGSFHYGINHAPIESLRFRCMFQANRAPGIGELFAPQVSLDNLE	651
XOO1706_pro	ATAGTRSDSGSIOQEVNMGAPTPDSGGFTINDAFGFIPLIDNPVYALSLAEGVRYTSFKTSSNTSDEYGSFHYGINHAPIESLRFRCMFQANRAPGIGELFAPQVSLDNLE	651
XCV3187_pro	ETG...SFSFDALAQTSIGDLAGPTFGYNNLNUVYALCOUPLADIPCAKEVYTLATRYSDVDTFGNTINS...KFGFKHQPESVULVGTGUSEGTPRATVADPGLGSGSFENYTS	657
XAC3050_pro	ESG...YDSFDALIASGNTTGHARTPTSGSYSLDEAYLEISIPLLKDLIPGARTLEFDIASRYSDVDTFGNTINS...KFGFKHQPESVULVGTGUSEGTPRATVADPGLGSGSFENYTS	668
XC_1241_pro	ESG...QPDFAFIAAGLSFGHARTPTSGSYSLDEAYLEISIPLLKDLIPGARTLEFDIASRYSDVDTFGNTINS...KFGFKHQPESVULVGTGUSEGTPRATVADPGLGSGSFENYTS	608
XCC2867_pro	ESG...QPDFAFIAAGLSFGHARTPTSGSYSLDEAYLEISIPLLKDLIPGARTLEFDIASRYSDVDTFGNTINS...KFGFKHQPESVULVGTGUSEGTPRATVADPGLGSGSFENYTS	608
Tdrxoo_pro	TDPCAGGAIISAAQNVPGTSLNLCVQTGVPA...SAGLVAQPNAGQVNLVGGNLLDPEQADTCTHGLVWNP...TSNFANTLDNKKIEMKTISSQVDDVISGCDPAPNPLGTF	764
XOO1706_pro	TDPCAGGAIISAAQNVPGTSLNLCVQTGVPA...SAGLVAQPNAGQVNLVGGNLLDPEQADTCTHGLVWNP...TSNFANTLDNKKIEMKTISSQVDDVISGCDPAPNPLGTF	764
XCV3187_pro	.DPDQ...TSFGPAGANARCLADVAFGRONASGVAPAPGGE..QNVVPSVSGSTPTDPTSTSTKTLGLVWSPFITGLNASLDNKKIEMKTISSQVDDVISGCDPAPNPLGTF	765
XAC3050_pro	.DPDS...TTPGGGAYGLNATQARCTAG...VPAGGYDQNAQIRISITGGNPMKCPETSTSTKTLGLVWSPFITGLNASLDNKKIEMKTISSQVDDVISGCDPAPNPLGTF	771
XC_1241_pro	.DPDS...SOSGQLSNPVVAQNCALAGVPAN...TVQPGAGNGAKOTLEPTTWTSDNCLPPTSTSTKTLGLVWSPFITGLNASLDNKKIEMKTISSQVDDVISGCDPAPNPLGTF	717
XCC2867_pro	.DPDS...SOSGQLSNPVVAQNCALAGVPAN...TVQPGAGNGAKOTLEPTTWTSDNCLPPTSTSTKTLGLVWSPFITGLNASLDNKKIEMKTISSQVDDVISGCDPAPNPLGTF	717
Tdrxoo_pro	VSNALIGSPILTGTN...TTSRGISLILSNQGLTKTGDGLGRKGFDPGSMGRNLNAYDAILVTLTLESQATPESENDRCLGYTSVSCTPNSKVRSHIRSSSYNDLSVSLAWPTSK	883
XOO1706_pro	VSNALIGSPILTGTN...TTSRGISLILSNQGLTKTGDGLGRKGFDPGSMGRNLNAYDAILVTLTLESQATPESENDRCLGYTSVSCTPNSKVRSHIRSSSYNDLSVSLAWPTSK	883
XCV3187_pro	ESRGVGFTR...NNAE...NITSLSFGLRNAGVTEGDFDLNRRF..EQVNGFTSLNLYVSKNBLKADNS...TNPPSQQ.NGYGGRFVRBSNLSNWDQDUSVTWASRTSR	872
XAC3050_pro	AQAGCGFTS...AADG...SIADLSAGINTGISTVVEGDMTINLRFP..AQVNGFTSLNLYVSKNBLKADNS...TNPPSQQ.NGYGGRFVRBSNLSNWDQDUSVTWASRTSR	878
XC_1241_pro	AEYCALVTD...PHYADGATVTVNINMPLILNLSYKVECDLAVNRLP..ETATGFTTISWDSYLSNWTATADSELEQFGGRY..LNQDPYWRIRBSNLYVDSLQDFGINWGLRPTSG	833
XCC2867_pro	AEYCALVTD...PHYADGATVTVNINMPLILNLSYKVECDLAVNRLP..ETATGFTTISWDSYLSNWTATADSELEQFGGRY..LNQDPYWRIRBSNLYVDSLQDFGINWGLRPTSG	833
Tdrxoo_pro	NEVEPETG...TUFQS...TREPSTSTFDFGNYKLPNNAEVLNLSVAMLTNKKAPVVGNTIGDTTQNSGNTFPNFYDAGREFTLGHNTFS	968
XOO1706_pro	NEVEPETG...TUFQS...TREPSTSTFDFGNYKLPNNAEVLNLSVAMLTNKKAPVVGNTIGDTTQNSGNTFPNFYDAGREFTLGHNTFS	968
XCV3187_pro	TKERCFTDRCLPDPFAPFQG...STVGNLGLSNTFHLQVAYALPNAIVAGANNIFEHYSAPAYGQPNISGY...SYGGGVDI..GRFYMKYQOR	965
XAC3050_pro	QDECFPSBNDYFGQLCSNFDNADSDRSYNRIGATVNDVSFYVAPNARITLGLNNAFRRNPVSYTTFAN...SFDPCQTEVSGRFLYMQYRQK	972
XC_1241_pro	MAEACPLSTALAAQYCSDFRVTADGAEPNHHGATTYHDIQVRYSTPNAIVSVGLNNAFDEKGPVAYTSAN...RFDPCQTEVSGRFLYMQYRQK	927
XCC2867_pro	MAEACPLSTALAAQYCSDFRVTADGAEPNHHGATTYHDIQVRYSTPNAIVSVGLNNAFDEKGPVAYTSAN...RFDPCQTEVSGRFLYMQYRQK	927

图 4-20 Tdrxoo 在黄单胞菌属中氨基酸同源性分析

Fig.4-20. Amino acid alignments of Tdrxoo with Tdrxoo in *Xanthomonas* bacteria

在其它 *Xanthomonas* 菌株中, 受 *hrpX* 调节的基因在启动子中往往存在一个植物诱导型启动子 PIP 盒 (TTCG-N16-TTCG) (Fenselau and Bonas, 1995)。在 Xoo KACC10331 基因组中, 发现了 14 个 PIP 盒 (TTCG-N16-TTCGn), 其中 4 个 PIP 盒在 *hrp* 基因簇的启动子区, 一个与 *avr* 基因的启动子有关, 一个与富含亮氨酸的类 PopC 蛋白有关。剩余的 8 个分散在基因组中, 分别与肽酶、依赖于 TonB 受体蛋白、核糖核苷双磷酸还原酶和三个推测的蛋白有关 (Lee et al., 2005)。在 Xoo MAFF311018 基因组中, 存在 37 个拷贝的类似 PIP 盒 (TTCGn •• N15 •• TTCGn), 5 个位于 *hrp* 基因簇, 其它分布于整个基因组 (Hirokazu et al., 2005), 其中 XOO1706 与我们获得的 *tdrxoo* 基因几乎完全相同, 仅有一个碱基差异。分析 *tdrxoo*, 在其起始密码子上游 -117 bp 处具有 *hrp* 盒 (TTCG •• N16 •• TTCG) 和 PIP 盒 (TTCGT •• N16 •• TTCGC) (图 4-21), 推测该基因可能受



*hrpX*的调控。

```
1 ATCACTGATTTTATTAAAAATTTACTGAACGCCATCGGCCTGCAGCCGGTGGCGTTTTGCG
61 TTGTGGAGCAACAGCTCGGCCGGCACCTTCACAACCCTCTTCTTTTTCGTAACAGGACT
121 TTAATTTCGTCGCAACGCATATACCATCGGTTACCCCTGACGTTTTGGATCCGCTTTTT
181 CGGAACCCCCACAGGCAAAACAACCTTGGCAGTGCAGTACCCAAGATCACTTGGAGAGA
241 GAGCTAAATGAATTTTAAGTCCAACAAACTGCGCGACGCAGTTGTGCTCGCGTTGGTGCT
81 M N F K S N K L R D A V V L A L V L
301 CGGCACCGGTAATGCCGTTCTGTCTCAGCGACTGCGGTGCGCGACACCAAGCCAGCCGACGA
101 G T G N A V L S A T A V A Q T K P A D E
361 AGCAGCAACACTAGACGCGATCAACGTCACCGGTAGCCGTATCTCGACGCCGGGCTGAC
121 A A T L D A I N V T G S R I S T P G L T
421 CACGAGCAGCCCGGTCACGAGCATTTGAGCGTGAAGATTTTCATGCGCACGCAGCCTGTTGC
141 T S S P V T S I E R E D F M R T Q P V A
481 CGTAGAAGAATTCGTCAAGCAGCTGCCGAGTGTTCGCCGACCGTCGGTCTGGTACGAA
161 V E E F V K Q L P S V S P T V G P G T N
541 CAACGGCGCCACTGGTGCAGCAACTCGACCTGCGCGGCTGGGTTGCAACCGCACGCT
181 N G A T G A A E L D L R G L G S N R T L
601 GGTGCTAGTCGATGGCCGCCGTCGCGTTCCGTACGATCTTCCGGTGTCTGTGACACCAA
201 V L V D G R R P V P Y D L S G V V D T N
661 TACGATTCCTGTAGCGCTTATCCAAAGTGTGGATTTGCTGACCGGTGGCGCATCCGTGGT
221 T I P V A L I Q S V D L L T G G A S V V
721 CTACGGTGTGACGCCATTTCCGGTGTGCGAAACTTCATCTGCGCCGCGACTTCGAAGG
241 Y G A D A I S G V A N F I L R R D F E G
781 CGTTGAGGTTACAGAGCTCTTACGGTCAATCCAAATATGGCGATGGTGCGCGTCAGCGCAT
261 V E V Q S S Y G Q S K Y G D G A R Q R I
841 CGAAGCCACGATGGGCGCCAACCTCGTCCGACGGCAAAGGCAATGTGCTGTTACGTGTGGG
281 E A T M G A N S S D G K G N V V F S V G
901 TCACACCAAAGTTGACCCGGTTTCCAGGGCGATCGTGCCTGGGGGAAAGTGTACGCTC
301 H T K V D P V F Q G D R A W G K V S R S
961 TTCTGCTAACGGACGTCCACAGGGCTCGGGACCAACCGTACCTTCGCTGATCGTGGGTCC
321 S A N G R P Q G S G T T V P S L I V G P
1021 GCCCGGCGTGTGGGGCACCCAGGTGATGACGGCACACTGGACGGCAGAGGTGATCGA
341 P G V W G T P G D D G T L D G R G Q I D
1081 CCCGACACCGGCCAGATTGTGACGACGTCCAAACGTATAACTTCAATCCGATCAACCT
361 P T T G Q I V S D V Q T Y N F I N L
1141 TTTCCAGACCGGACTGGATCGGTATCAGGCAACCGCGCTGGGCGCTACGAAATCAACGA
381 F Q T G L D R Y Q A T A L G R Y E I N E
1201 GCATGCTGAAGCGTACGGCCAGGTGAATTACACCGCTCACGCGTGGAAGCATCTCTGGC
401 H A E A Y G Q V N Y T R S R V L A
1261 ACCGAGCGGCTTGTTTCAAGAAGCGTTCGACATGCCGATTGGCAACCCCTGATTCCTGA
421 P S G L F Q E A F D M P I G N P L I P E
1321 ACCTGCTCGCCAGCAGCTGTGCCAAGCGTATGGCATCGACGCTGCCAAGTGCCTCCGGG
441 P A R Q Q L L C Q A Y G I D A N C T V P G
1381 CAACGCAACCATGATCGAAGGCTGACGATTTGGCCGTCGCTGACGAGCTTGGCCACG
461 N A T M I E G L T I G R R L T E L G P R
1441 CACCGATCGCTTCGATACCAAGACCTTCCAGGTGACTGCCGGTCTGCGTGGCGCCATTAC
481 T D R F D T K T F Q V T A G L R G A I T
1501 CGATAACTGGAAGTACGACGCTTCTGGTGCACGGTGAATCTGAGCGTCTTGCCGAATC
501 D N W K Y D A F W S H G E S E R L A E S
1561 TCGCAACTGGGGCTCGCTGTCCAAGACCCGCCAAGCCTTGATGTCTCTCGATGGCAGCAC
521 R N W G S L S K T R Q A L M S L D G S T
1621 TTGCGTTGATCCGAGCAATGGCTGCGTACCGCTCAATGTCTGGGGTCCGGAAGGTTCTGT
541 C V D P S N G C V P L N V W G P E G S V
1681 TTCGCCAGAAGCACTCAAGTTTATCAATTTGAGTGCTTTCTCGATCCAGAACGTTGAGCA
561 S P E A L K F I N L S A F S I Q N V E Q
1741 GGACAATGCCGCGCTCAACGTCAGCGGCGATCTGGGTGGATTCAAGAGCCCTTGGTCGGA
581 D N A A L N V S G D L G G F K S P W S E
1801 ATATCCGATTGGTGTGCTGTGGGCGCGAGCACCGTCGTGCAACGGCTGGTACACGTTT
601 Y P I G V A V G A E H R R A T A G T R S
1861 GGACGGCCCGAGCCAGATCCAGGGTGAAGTCATGGGCACCGGCGCGCCGACCCCGGATAG
621 D G P S Q I Q G E V M G T G A P T P D S
1921 CCAGGGCGGCTTTACGATCAACGAAGCATTGGCGAATTTATCGTCCCTTGATCGATAA
641 Q G G F T I N E A F G E F I V P L I D N
1981 CGCACCGGGTGTCTACGCGCTCTCGCTGGAAGCCGGCTACCGCTACTCCGATTTCAAGAC
661 A P G V Y A L S L E A G Y R Y S D F K T
2041 CAGCTCCAATACCAGCGACGAATACGGCAGCTTCAAGTACGGCATCAACTGGGCGCCTAT
681 S S N T S D E Y G S F K Y G I N W A P I
2101 TGAAAGTCTGCGTTTCCGCGGATGTTCCAGCGCGCAACCGTGCACCTGGCATTGGTGA
701 E S L R F R G M F Q R A N R A P G I G E
```

```

2161      GCTGTTTGCTCCGCAGGTTACCAGCCTGGACAACCTGGAGACCGATCCGTGCGCCGGCGG
721      L F A P Q V T S L D N L E T D P C A G G
2221      TGCAATCAGCGCGGCACAAGCGAATGTGCCGGGCACGCTGTCCAACCTGTGCGTGCAGAC
741      A I S A A Q A N V P G T L S N L C V Q T
2281      CGGTGTTCTGCGGCTCGGCTGGCTGGTTGCGCAACCTAATGCTGGTCAAGTCAATGT
761      G V P A G S A G L V A Q P N A G Q V N V
2341      CCTGACCGGTGGCAATCTGCTGCTGACTCCGGAGCAGGCGGACACGCAGACGATTGGCCT
781      L T G G N L L L T P E Q A D T Q T I G L
2401      GGTCTGGAACCCACCTCCAACCTTCGCCATGACGCTGGACTACTGGAAGATTGAGATGGA
801      V W N P T S N F A M T L D Y W K I E M E
2461      AAAAACCATCTCCTCGCAGAGCGTCGATGACGTTATTTCCGGCTGCTATGACCCTGCGTT
821      K T I S S Q S V D D V I S G C Y D P A F
2521      CAATCCTGGCCTGACCTTCAATAGCAACTGCGCCCTAATTGGACGGTGCCTGTTGACGGG
841      N P G L T F N S N C A L I G R S P L T G
2581      CACCTTCAACGGCACCACCTCTCGCGGCATTTGCTGATCTTGAGCAACCAGGGTACGTT
861      T F N G T T S R G I S L I L S N Q G T L
2641      GAAGACCGACGGCTTCGATCTCGGCCTGAAGTATGGCTTCGATCTACCGGGCTCGATGGG
881      K T D G F D L G L K Y G F D L P G S M G
2701      CCGCCTGAACCTGGCCTACGACGCAACCTTGGTGACCACCCTGGAATCGCAGGCCACTCC
901      R L N L A Y D A T L V T T L E S Q A T P
2761      TGAATCGGAAAACCGTGATTGTCTGGGTTACTACAGCGTCAGCTGCACGCCAACTCGAA
921      E S E N R D C L G Y Y S V S C T P N S K
2821      GTACCGCTCCATCCTGCGCTCCAGCTGGTCCTACAACGATCTGTGCGGTGTCATTGGCATG
941      Y R S I L R S S W S Y N D L S V S L A W
2881      GCGTTACAACAGCAAGATGGAAGTGGAGCCTGAAACCGGCACATGGTTTCAGAGCTACCG
961      R Y N S K M E V E P E T G T W F Q S Y R
2941      CGAAATCCCGTCGTATAGCTACTTTGATTTTGGCGTGAACCTACAAGCTGCCCTTCAATGC
981      E I P S Y S Y F D F G V N Y K L P F N A
3001      CGAAGTCAACCTGTGCGGTGGCCAACCTGACGAACAAGAAGGCGCCAGTCGTGCGCAATAC
1001      E V N L S V A N L T N K K A P V V G N T
3061      GATCGGTGACACCACTCAGAACAGCGCAATACGTTCCCGAACTTCTACGATGCAATCGG
1021      I G D T T Q N S G N T F P N F Y D A I G
3121      TCGTTTTTACAGCTGGGCATGACGTTCTCCTTCTAAATCGAAGGAGTCGTTGCCAGTTGC
1041      R F Y T L G M T F S F *
3181      AAGGGGCGGGCCGCATGCGGCCCCGCCCTTTTTTGTTCATGCCAGCGCGAAAAGCAGGTAC
3241      TGCGCGTTTCGATCTCACCACGTCAGC

```

图 4-21 *tdrxoo* 核苷酸序列和氨基酸序列分析Fig. 4-21. The sequence of nucleic acid and amino acid of *tdrxoo*

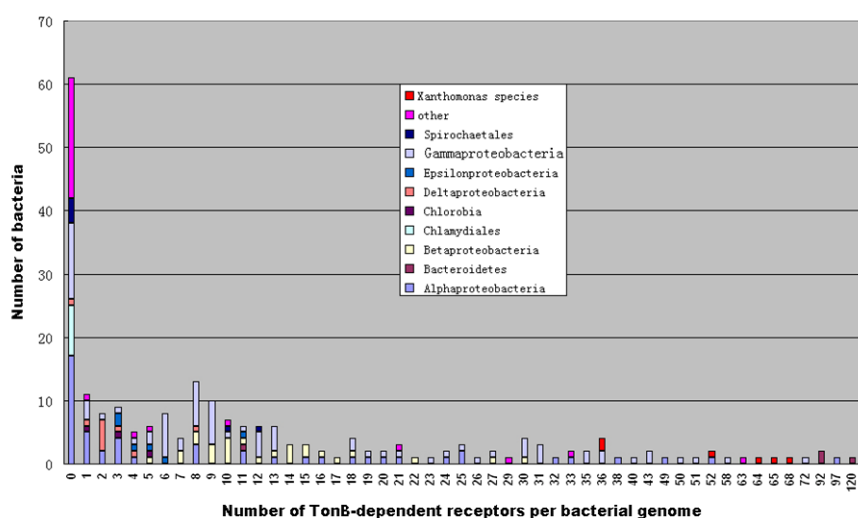
蓝色为 PIP 盒；浅蓝色为起始密码子；红色为终止密码子

PIP box (blue), start code (light blue), stop code (red)

#### 4.3.12 *tdr* 基因分析

搜索 226 种革兰氏阴性菌基因组序列，结果显示，大部分细菌（71%）在其各自基因组中拥有少于 14 个 TDR 蛋白，27% 的细菌不具有 TDR 蛋白，43% 的细菌含有 TDR 蛋白的数量在 1-13 之间。只有 15.5% 的细菌基因组具有超过 30 个 TDR 蛋白，这些细菌绝大部分属于  $\alpha$  或  $\gamma$ -变形菌纲（Proteobacteria）或者拟杆菌属（Bacteroides）（图 4-22），TDR 蛋白在该纲细菌中存在数量如此之多，推测 *tdr* 基因在  $\gamma$ -变形菌纲具有非常重要的作用。

6 个黄单胞菌株：柑桔溃疡病菌(Xac 306)、甘蓝黑腐病菌(Xcc 8004 和 ATCC 33913)、辣椒斑点病菌(Xcv 85-10)、水稻白叶枯病菌(Xoo KACC10331 和 MAFF 311018)基因组中分别存在 68、65、64、52、36 和 36 个 *tdr* 基因（图 4-22）。在黄单胞细菌中目前仅有少数 *tdr* 类基因涉及到铁离子运输，其他的功能仍是未知的。

图 4-22 革兰氏阴性菌中 *tdr* 基因的统计分析Fig.4-22. Occurrence of *tdr* genes in completely sequenced Gram-negative bacterial genomes

## 4.4 讨论

TonB-Dep-Rec类蛋白最初是作为铁离子转运载体而为研究人员所熟知 (Braun, 1995)。由位于细菌细胞内膜的TonB-ExbB-ExbD复合体提供能量, 位于外膜的依赖于TonB的受体特异性识别结合有三价铁离子的铁载体, 将三价铁离子从细菌细胞外转运至周质空间 (Larsen *et al.*, 1996)。在梨火疫病菌 (*E. amylovora*) 中, *foxR* 基因编码 TonB-Dep-Rec 蛋白特异性识别去铁胺 (desferrioxamine), 该基因的突变破坏了铁离子转运途径, 造成了 *E. amylovora* 在寄主苹果上定殖能力的减弱和毒性的丧失 (Dellagi *et al.*, 1999)。在 *E. chrysanthemi* 中, *tonB* 突变体只能浸染侵染位点, 但菌体却不能从侵染位点扩散 (Enard and Expert, 2000)。在 Xcc 中, *tonB-exbB1-exbD1* 基因簇是激发非寄主植物 HR 反应和引起寄主花椰菜黑腐病症状所必需的 (Wiggerich and Pühler, 2000), 突变体仅仅能在花椰菜的叶片上引起小的非常干的斑点而不是典型的黑腐病症状, 但是突变体能从侵染位点扩散。FeoB 是革兰氏阴性细菌的一个主要铁运输体, 它的突变能引起多种病原细菌致病性的丧失, 包括 *E. coli*, *S. typhimurium*, *Legionella pneumophila* 和 *Helicobacter pylori* (Stojiljkovic *et al.*, 1993; Robey and Cianciotto 2002; Velayudhan *et al.*, 2000)。在 Xac、Xcc 和 Xoo (da Silva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005) 中也存在 FeoB 的同源物, 但是尚未有关于这些基因突变研究的文献。细胞内过量的铁离子对细菌细胞是具有毒害作用的,  $\text{Fe}^{2+}$  可以催化电解氧化反应, 产生对细胞具有破坏作用的羟基自由基。因此, 许多细菌通过 Fur (Ferric Uptake Regulator) 调控子严密地调控离子转运系统的活动。在黄单胞属细菌中也存在 *fur* 基因同源物 (Loprasert *et al.*, 1999)。Xoo 中 *fur* 基因的突变导致嗜铁素的过量产生 (Subramoni and Sonti, 2005), 突变体的过氧化氢酶活性减弱, 对过氧化氢敏感, 在水稻叶片内生长缓慢, 如果添加抗坏血酸则可以缓解突变体在水稻体内生长缓慢症状。有关黄单胞菌是如何通过 *fur* 调控离子转运系统的机制, 尚需在实验室条件下和宿主体内开展更深入的研究。

本研究通过 Y2H, 发现了与 GacA<sub>Xoo</sub> 互作的蛋白的基因 *tdrxoo*, 突变该基因可以引起 Xoo 多效性表型变化, 包括致病性、运动性、胞外多糖、生物被膜形成、胞外酶类活性和细菌生长。



在 *R. solanacearum*, PrhA 作为一个外膜蛋白受体,虽然具有与依赖于 TonB 的铁载体受体相似的结构,但是 PrhA 并不能感应细菌细胞外铁离子的浓度,反而感应来自拟南芥或烟草悬浮细胞的非扩散性信号分子,通过其 N-端与位于内膜的 PrhR 蛋白的 C-端互作,将信号传递到细胞质,PrhR 和 ECF 类  $\sigma$  因子 PrhI 的相互作用会激活 PrhI,被激活的 PrhI 感受来自环境中的植物信号,激活 *prhJ*, *hrpG* 和 *hrpB* 基因,进而激活整个 *hrp* 基因簇。因此可以说 PrhA 作为一个受体,位于这个信号级联调控途径的顶级位置,接受来自植物特异性信号,但是突变 *prhA* 基因, *R. solanacearum* 对烟草和拟南芥仍具有致病性 (Marenda *et al.*, 1998; Belen *et al.*, 1999, 2002; Didier *et al.*, 2000)。

根据 *R. solanacearum* 中 *prhA* 基因的序列,在 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 中也发现了 *prhA*, 该基因同样具有 Tdr 结构域,突变该基因造成 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 致病性丧失,不能引起非寄主植物烟草叶片过敏性反应,但仍能引起水稻幼苗叶片的水渍症状,突变菌株 *hap1* 基因的表达并不受 *prhA* 突变的影响 (Zou, *et al.*, 2006)。

我们的实验结果表明突变 *tdrxoo* 导致 Xoo 致病性丧失,但是仍能引起烟草的过敏性反应。 $\Delta$  *tdrxoo* 致病性的丧失可能是一个综合的复杂的过程,  $\Delta$  *tdrxoo* 并不产生胞外多糖,不具有胞外纤维素酶和木聚糖酶活性。胞外多糖和胞外酶类对植物病原细菌的毒性具有非常重要的作用,目前具体哪种胞外酶影响病原细菌的致病性还不是很清楚,但是胞外酶泌出机制发生突变会使病原细菌的致病性丧失 (Andro *et al.*, 1984; Hinton *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 2005), 本研究中 *tdrxoo* 基因究竟是调控胞外酶产生过程还是泌出机制,还需进一步研究。EPS 对 Xoo 致病性具有非常重要的作用,其原因可能是:首先, EPS 中含有大量水份,在细菌入侵到充满空气的植物细胞间隙生长时提供水份,防止干燥对细胞生长的抑制;其次, EPS 的粘附性有利于病菌粘附到植物细胞表面,其中含有的物质可能具有细胞识别作用;第三, Xoo 进入水稻导管组织后,起机械堵塞作用,影响植株体内水分的运输。因此,合成和调控 EPS 的基因突变后,对 Xoo 的毒性,特别是对受侵染寄主的显症有重要影响, *tdrxoo* 以何种方式参与 EPS 的合成或调控,目前还是未知。

*tdrxoo* 基因与 *R. solanacearum* 和 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 中的 *prhA* 比较,发现三者核苷酸同源率为 41%,氨基酸同源性仅为 15%,因此 *tdrxoo* 基因明显不同于上述两个基因,其参与调控的途径可能是一个全新的信号途径,这或许是 *tdrxoo* 突变体与 *R. solanacearum* 和 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 的 *prhA* 突变体表型有差异的原因。

最近,研究发现新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 基因组内含有 67 个 *tdr* 基因,其中 *malA* 是 *C. crescentus* 运输麦芽糖糊精 (maltodextrins) 所必需的,由于 *C. crescentus* 生存在淡水环境中,营养比较匮乏, *C. crescentus* 通过表面膜蛋白富集水中的营养成分, MalA 从 ExbB/ExbD 获得能量,将麦芽糖糊精主动运输到细胞内 (Neugebauer *et al.*, 2005)。*malA* 基因的突变使得 *C. crescentus* 不能转运麦芽糖糊精,生长受到抑制。在 Xcc 中, *suxABCR* 由相邻的四个基因组成,参与蔗糖的运输和代谢。*suxA* 具有 TDR 结构域, *suxB* 编码蔗糖水解酶, *suxC* 编码蔗糖运输蛋白,辅助底物分子通过细菌细胞内膜; *suxR* 编码 LacI/GalR 类转录抑制子。*suxA*、*suxB* 和 *suxC* 的分别突变,均导致 Xcc 相似的表型变化,包括致病性丧失和生长缓慢 (Blancvillain *et al.*, 2007)。分析 *tdrxoo* 在 Xoo 基因组中的位置,其相邻上游两个 ORF 中 XOO1806 为内膜转运蛋白, XOO1807 为热激蛋白基因,相邻下游两个 ORF 中 XOO1803 为水解酶基因, XOO1804 为 *TetR* 转录调控抑制子,具有 HTH 结构域。*tdrxoo* 基因簇类似于 Xcc 中 *suxABCR* 基因簇,因此推测 Tdrxoo 参与了蔗糖代谢和运输。

由于 *tdrxoo* 的突变, 导致了 Xoo 不能利用培养基中的蔗糖作为碳源, 因此突变体生长缓慢, 进而影响到其他的生理生化过程, 包括胞外酶活性, 运动能力下降和生物被膜形成。

通过分析 *tdr* 类基因在革兰氏阴性菌中的分布, 发现 *tdr* 类基因在黄单胞菌属中是保守的, 在 Xac、Xcc 8004 和 ATCC 33913、Xcv、Xoo KACC10331 和 MAFF 311018 基因组中分别存在 68、65、64、52、36 和 36 个 *tdr* 基因。在 226 种革兰氏阴性菌中, *tdr* 类基因分布存在很大差异, 27% 的细菌不具有 *tdr* 基因, 15.5% 的细菌基因组具有超过 30 个 *tdr* 蛋白, 在 *Bacteroides thetaiotaomicron* 更是达到了 120 个, 这些细菌绝大部分属于  $\alpha$  或  $\gamma$ -变形菌纲 (*Proteobacteria*) 或者拟杆菌属 (*Bacteroides*)。  $\gamma$ -变形菌纲包括一些医学上和科学研究中很重要的类群, 如肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、弧菌科 (*Vibrio*)、假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) 和黄单胞菌科 (*Xanthomonadaceae*) 等。很多重要的人类、动物和植物病原细菌都属于这个纲, 如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、耶尔辛氏菌属 (*Yersinia*)、弧菌属 (*Vibrio fischeri*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 等, 重要的模式生物 *E. coli* 也属于此纲。为什么众多的 *tdr* 基因存在于这些致病菌中, 其功能如何目前尚未知晓, 不过随着基因组测序技术的成熟, microarray 技术的发展以及高通量分析技术的应用等会加速这些谜团的破解。

TDR蛋白参与细菌多种分子透过外膜的过程, 如铁离子吸收和营养成分的运输。细菌的外膜是选择性通透膜, 能阻挡溶于水的物质通过, 包括许多营养成分和离子。然而在外膜上有整合蛋白, 称为外膜蛋白, 这些蛋白识别和运输细胞所需的营养成分和离子进入细胞内。外膜蛋白一部分特异性识别某些物质, 运输这些物质通过外膜, 称为孔蛋白; 另一部分为依赖于TonB的受体蛋白, 早期研究认为其与铁离子和维生素B<sub>12</sub>的运输有关。但是近来在一些革兰氏阴性菌中TDR蛋白负责营养成分的运输和代谢, 如蔗糖和麦芽糖糊精。这个运输过程是耗能的, 一般认为革兰氏阴性细菌外膜与周质间无任何能量来源, 推测分子透过外膜所需能量可能主要来自内膜的原动力或细胞质内的ATP (Braun *et al.*, 1995)。TonB蛋白行使能量传递的功能, 提供外膜受体蛋白向胞内输送铁离子或营养成分的能量。因此, 该途径的基因突变将影响铁离子的运输和营养成分的吸收, 进而影响细菌的生长。Tdrxoo蛋白在Xoo中的作用至今尚未有报道, 本研究初步阐述了Tdrxoo在Xoo中的功能, 然而Tdrxoo是通过什么机制影响Xoo诸多表型的变化仍不清楚。

Tdrxoo 与外膜蛋白具有同源性, 具有接受胞外信号的胞外环, 那么 Tdrxoo 接受哪些信号呢并且这些信号是怎样通过 Tdrxoo 基因被传递的呢? 信号分子是直接结合到 Tdrxoo 受体结构域, 还是通过 Tdrxoo 形成的配体通道进入细胞内的? 但是不管怎样, 信号传递过程是依赖于 TonB-ExbB-ExbD 能量传递复合体的。

以 GacAxoo 为诱饵, 通过 Y2H 获得了 Tdrxoo 蛋白, 二者的互作在酵母细胞内得到了证实。但是同时突变 *gacAxoo* 和 *tdrxoo* 时,  $\Delta gacAxoo/\Delta tdrxoo$  和  $\Delta tdrxoo$  的表型变化并无明显差异, 我们推测 *gacAxoo* 只是 *tdrxoo* 调控途径的一个分支 (图 4-23), 由于基因冗余, *gacAxoo* 基因突变后, 可能存在其他功能相似的基因仍在起作用, 所以 *gacAxoo* 突变体的表型变化并不明显。然而, 推测 *tdrxoo* 位于 Xoo 细胞的外膜, 负责接受来自植物或环境中的信号。突变 *tdrxoo* 基因后, 可能导致体外信号不能被识别, 或者营养成分转运受到影响, 因而突变体表型变化非常明显。

综上所述, 推测在Xoo中存在Tdrxoo/GacAxoo调控途径 (图 4-23)。Tdrxoo识别细胞外信号或者营养成分, 将信号或者营养物质转运至细胞内, 调控Xoo运动性、致病性、胞外多糖产生、胞

外酶类活性、生物被膜形成以及细菌的生长，但是调控机制有待进一步研究。GacA<sub>xoo</sub>与Tdrxoo互动，调控Xoo运动性相关基因的表达。采用microarray技术分析PXO99<sup>A</sup>与Δ*gacA<sub>xoo</sub>*基因表达谱的差异，表明在Δ*gacA<sub>xoo</sub>*中，*fleQ*、*flgC*、*fliC*、*fliO*和*cheA*基因表达下调（本实验室资料），上述基因均位于Xoo鞭毛基因簇，表明GacA<sub>xoo</sub>确实参与了Xoo运动性调控。

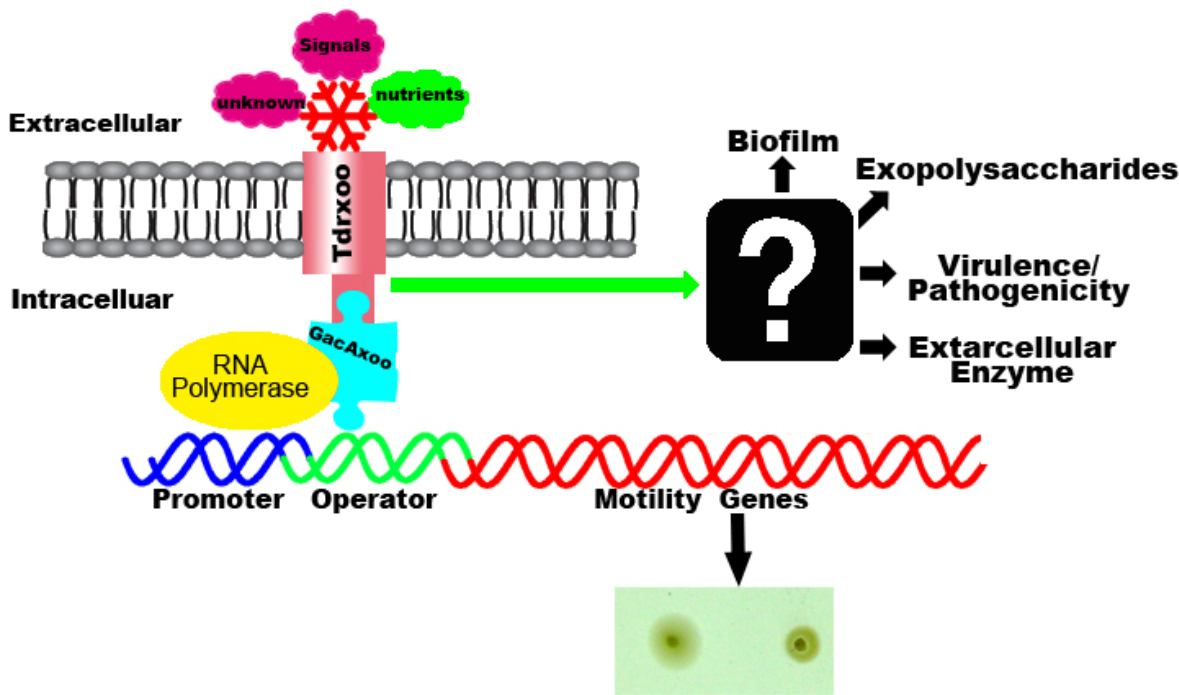


图 4-23 Tdrxoo/GacA<sub>xoo</sub> 调控途径示意图

Fig.4-23. Model of the regulatory pathway of Tdrxoo/GacA<sub>xoo</sub>

## 第五章 全文结论

本研究的完成得到以下结论:

1. GacA<sub>Xoo</sub> 调控了 Xoo 的运动性。采用标记置换方法对 *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因进行突变分析, 与野生型菌株相比,  $\Delta$  *gacA<sub>Xoo</sub>* 的运动性减弱。但是突变体的致病性、胞外酶分泌和诱导非寄主植物烟草产生 HR 的能力未发生明显改变。基因功能互补分析表明,  $\Delta$  *gacA<sub>Xoo</sub>* 运动能力恢复至野生型菌株水平。
2. 通过 Y2H 筛选到与 GacA<sub>Xoo</sub> 互作的、具有 TonB-dependent receptor 结构域的 Tdrxoo 蛋白。该蛋白具有接收胞外信号功能的胞外环和跨膜功能的反向  $\beta$ -折叠桶结构。由于 Tdrxoo 与细菌外膜蛋白同源, 推测可能是位于细菌外膜, 接收来自细菌体外、目前尚不清楚的环境信号。
3. Tdrxoo 参与了 Xoo 多种生物学表型的表达, 包括致病性、运动性、胞外多糖产生、生物被膜形成、胞外酶活性和细菌生长。推测原因可能是 Tdrxoo 位于 Xoo 细胞的外膜, 负责接受来自植物或环境中的信号。突变 *tdrxoo* 基因后, 可能影响了 Xoo 对体外信号的识别以及营养成分(如蔗糖)的转运和吸收, 造成 Xoo 生长缓慢。
4. Tdrxoo 在黄单胞菌属中是保守的。通过分析 *tdr* 在革兰氏阴性细菌中的分布, 发现 *tdr* 基因在黄单胞菌属中是保守的, 在 Xac、Xcc 8004 和 ATCC 33913、Xcv、Xoo KACC10331 和 MAFF 311018 基因组中分别存在 68、65、64、52、36 和 36 个 *tdr* 类基因, 推测 Tdrxoo 在这些细菌中具有重要的作用。在 226 种革兰氏阴性细菌中, *tdr* 类基因分布存在很大差异, 27% 的细菌不具有 *tdr* 基因, 15.5% 的细菌基因组具有超过 30 个 *tdr* 蛋白, 这些细菌绝大部分属于  $\alpha$  或  $\gamma$ -变形菌纲或者拟杆菌属, 可能 Tdr 在这些细菌中具有特殊的功能。
5. 提出在 Xoo 中存在 Tdrxoo/GacA<sub>Xoo</sub> 调控途径。*tdrxoo* 编码位于细胞外膜的蛋白, 识别胞外环境中的信号, 并将信号传递至胞内, 根据 *tdrxoo* 在 Xoo 基因组中的位置以及  $\Delta$  *tdrxoo* 表型的变化, 表明 *tdrxoo* 可能参与糖代谢或者运输。*gacA<sub>Xoo</sub>* 位于 *tdrxoo/gacA<sub>Xoo</sub>* 调控途径下游, 可能参与 Xoo 运动性的调控。

下一步工作展望:

1. 在本研究中, *gacA<sub>Xoo</sub>* 参与了 Xoo 运动性调控, 结合其他细菌中 *gacA* 功能的研究, 表明 GacA<sub>Xoo</sub> 对 Xoo 运动性调控具有进化保守性, 那么 GacA<sub>Xoo</sub> 是以何种方式进行调控的? 应该结合高通量分析平台, 比较 PXO99<sup>A</sup> 和  $\Delta$  *gacA<sub>Xoo</sub>* 基因组表达谱, 从基因组水平阐明 *gacA<sub>Xoo</sub>* 对 Xoo 运动性的调控机理。
2. GacA<sub>Xoo</sub> 功能的进化保守性, 揭示了存在某些环境或生理信号激活 *gacA<sub>Xoo</sub>*, 这种信号或许在人类、动物和植物中均具有活性, 获得这种信号物质对于新型医药开发具有非常大的诱惑性。
3. Tdrxoo 蛋白位于细菌的外膜, 同时具有胞外环, 可以接受胞外信号, 那么 Tdrxoo 接受哪些信号呢? 这些信号是怎样通过 Tdrxoo 基因被传递的呢? 信号分子是直接结合到 Tdrxoo 受体结构域, 还是通过 Tdrxoo 形成的配体通道进入细胞内? 如果这种信号分子存在, 那么发现它不仅可以为防治水稻白叶枯病提供理论依据, 而且可以作为新型农药开发。

4. *tdrxoo* 的突变所引起的 Xoo 多效性表型变化,说明其对于 Xoo 是至关重要的,因此有必要知道其具体的调控机制。下一步对本文提出的 *tdrxoo* 基因簇内的基因进行功能分析,明确 *tdrxoo* 基因簇的调控机理。
5. *tdr* 类基因在黄单胞菌中存在数量众多,其具体的功能报道很少,部分 *tdr* 类基因参与了铁离子运输,但是大部分 *tdr* 类基因的功能未知,本文分析 Xoo 基因组中存在 36 个 *tdr* 类基因,对这些基因的功能进行分析,结合高通量的基因组表达谱分析工具,逐步阐明 *tdr* 类基因在 Xoo 中的作用。



## 参考文献

1. 方中达. 中国水稻白叶枯病菌致病类型的研究. 植物病理学报, 1990, 20:81-87.
2. 何晨阳, 王金生. 植物过敏反应中的生理生化变化. 植物生理学通讯. 1996, 32(2):150-154.
3. 萨姆布鲁克(Sambrook J), 拉塞尔(Russell D W), 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社, 2002.
4. 王金生. 分子植物病理学 北京 中国农业出版社 1999.
5. Aarons S., Abbas A., Adams C., *et al.* A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens*. J Bacteriol, 2000, 182:3913-3919.
6. Ackerveken V.D., Marois E., Bonas U. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. Cell, 1996, 87:1307-1316.
7. Akerley B.J., Rubin E.J., Camilli A., *et al.* Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(15): 8927-8932.
8. Albright L.M., Huala E., Ausubel F.M. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. Annu Rev Genet, 1989, 23:311-336.
9. Alfano J.R., Charkowski A.O., Deng W.L., *et al.* The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(9): 4856-4861.
10. Alfano J.R., Collmer A., The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. J Bacteriol, 1997, 179(18):5655-5662.
11. Altier C., Suyemoto M., Ruiz A.I., *et al.* Characterization of two novel regulatory genes affection *Salmonella* invasion gene expression. Mol Microbiol, 2000, 31:971-982.
12. Andrade M.O., Alegria M.C., Guzzo C.R., *et al.* The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv citri. Mol Microbiol, 2006, 62(2):537-551.
13. Andro T., Chambost J.P., Kotoujansky A., *et al.* Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. J Bacteriol, 1984, 160(3):1199-1203.
14. Brencic A., and Winans S.C., Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(1):155-194.
15. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. two-component signal transduction. Annu Rev Biochem, 2000, 69:183-215.
16. Page A.L., and Parsot C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. Mol Microbiol, 2002, 46(1):1-11.
17. Arlat M., Van Gijsegem F., Huet J.C., *et al.* PopA1, a protein which induces hypersensitivity like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO J, 1994, 13(3):543-553

18. Badel J.L., Nomura K., Bandyopadhyay S., *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Mol Microbiol*, 2003, 49(5):1239-1251.
19. Bai J., Choi S.H., Ponciano G., *et al.* *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13:1322-1329.
20. Barber C.E., Tang J.L., Feng J.X., *et al.* A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol*, 1997, 24:555-566.
21. Bayot R.G., and Ries S.M. Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology*, 1986, 76:441-445.
22. Beattie G.A. and Lindow. S.E. Epiphytic fitness of phytopathogenic bacteria: physiological adaptations for growth and survival. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994. 192:1-27
23. Belen B., Didier A., Patrick B., *et al.* A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, 15(2):109-119.
24. Belen B., Marc M., Patrick B., *et al.* *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*, 1999, 31(1):237-251.
25. Bender C.L., Alarcon-Chaidez F., Gross D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 63:266-292.
26. Berg D.E., Howe M.M (eds). *Mobile DNA*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1989, 185-210.
27. Birkenbihl R.P. and Vielmetter W. Complete maps of IS1, IS2, IS3, IS4, IS5, IS30 and IS150 locations in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, 1989, 220:147-153.
28. Blanvillain S., Meyer D., Boulanger A., *et al.* Plant carbohydrate scavenging through TonB-Dependent receptors: A feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS ONE*, 2007, 2(2):e224. doi: 10.1371/journal.pone.0000224.
29. Bonas U., Schulte R., Fenselau S., *et al.* Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1991, 4:81-88.
30. Bonas U., Stall R.E., Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218:127-136.
31. Braun V. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer

- membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. FEMS Microbiol Rev, 16(4):295-307.
32. Brelles-Marino G, Bedmar E.J., Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. J Biotechnol, 2001, 91(2-3):197-209.
33. Buell C.R., Joardar V., Lindeberg M., *et al.* The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl Acad. Sci., 2003, 100:10181-10186.
34. Bull C.T., Du.B., Voisard C., *et al.* Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. Antonie van Leeuwenhoek, 2001, 79:327-336.
35. Buttner D., Nennstiel D., Bonas U., *et al.* Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. J Bacteriol, 2002, 184:2389-2398.
36. Cao H., Baldini R.L., Rahme L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. Annu Rev Phytopathol, 2001, 39:259-284.
37. Cha C., Gao P., Chen Y.C., *et al.* Production of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. Mol Plant-Microbe Interact, 1988, 11:1119-1129.
38. Chan J. and Goodwin P.H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnol Advances, 1999, 17:489-508.
39. Chancey S.T., Wood D.W., Pierson III L.S. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:2294-2299.
40. Charles T.C. and Nester E.W. A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, 1993, 175(20):6614-6625
41. Chatterjee A., Cui Y., Yang H., *et al.* GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. Mol Plant-Microbe Interact, 2003, 16(12):1106-1117.
42. Chatterjee S. and Sonti R.V. *rpfF* Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. Mol Plant-Microbe Interact, 2002, 15(2):463-471.
43. Chen J.H., Hsieh Y.Y., Hsiao S.L., *et al.* Characterization of insertion of IS476 and two newly identified insertion sequences, IS1478 and IS 1479, in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. J Bacteriol, 1999, 181:1220-1228.
44. Chesnokova O., Coutinho J.B., Khan I.H., *et al.* Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. Mol Microbiol, 1997,

- 23(3):579-590.
45. Chieda Y., Iiyama K., Chisa Y.A., *et al.* Pathogenicity of *gacA* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 in the silkworm, *Bombyx mori*. FEMS Microbiol Lett, 2005, 244:181-186.
  46. Choi S.H. and Leach J.E. Genetic manipulation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, International Rice Research Notes, 1994, 19(2):31-32.
  47. Christophe D. and Dieter H. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in *Pseudomonads*. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(2):650-654.
  48. Colla Z.O. and Galan I.E. The Invasion-associated type III protein secretion system in salmonella-a review. Gene, 1997, 192:51-59.
  49. Collmer A., Badel J.L., Charkowski A.O., *et al.* *Pseudomonas syringae* *hrp* type III secretion system and effector proteins. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(16):8770-8777.
  50. Costacurta A. and Vander leyden J. Synthesis of phytohormone by plant-associated bacterial. Crit Rev Microbiol, 1995, 21:1-18.
  51. Coulter S.N., Schwan W.R., Ng E.Y., *et al.* *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. Mol Microbiol, 1998, 30(2):393-404.
  52. Cruz C.M.V., Bai J.F., Ona I., *et al.* Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97:13500-13505.
  53. Cui Y., Chatterjee A., Chatterjee A.K. Effects of the Two-Component System Comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the Production of Global Regulatory *rsmB* RNA, Extracellular Enzymes, and Harpin<sub>Ecc</sub>. Mol Plant-Microbe Interact, 2001, 14(4):516-526.
  54. Da Re S., Schumacher J., Rousseau P., *et al* Phosphorylation-induced dimerization of the FixJ receiver domain. Mol Microbiol, 1999, 34:504-511.
  55. 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 (6887):459-463.
  56. da Silva F.G., Shen Y., Dardick C., *et al.* Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice *Xa21*-mediated innate immune response. Mol Plant-Microbe Interact, 2004, 17:593-601.
  57. Dangi J.L. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. Curr Top Microbiol Immunol, 1994:192:99-118.
  58. Daniels and Leach. Genetics of *Xanthomonas*. In: J.G.Swings and E.L.Civerolo (eds). *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall, 1993, 301-339.
  59. David O., Ronald P.C., Bogdanove A.J., *et al.* *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. Mol Plant Pathol, 2006, 7(5):303-324.
  60. Dellagi A., Reis D., Vian B., *et al.* Expression of the Ferrioxamine receptor gene of *Erwinia amylovoar* CFBP 1430 during pathogenesis. Mol Plant-Microbe Interact, 1999,12(5):463-466.
  61. Dennis G.C., Li Y.H., Ellen R.P. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal

- infections. J Clin Invest, 2003, 112:1626-1632.
62. Devine S.E. and Boeke J.D. Efficient integration of artificial transposons into plasmid targets *in vitro*: a useful tool for DNA mapping, sequencing and genetic analysis. Nucleic Acids Res, 1994, 22(18):3765-3772.
63. Dharmapuri S. and Sonti R.V. A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. FEMS Microbiol Lett, 1999, 179:53-59.
64. Dharmapuri S., Yashitola J., Vishnupriya M.R., *et al.* Novel genomic locus with atypical G+C content that is required for extracellular polysaccharide production and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol Plant-Microbe Interact, 2001, 14(11):1335-1339.
65. Didier A., Belen B., Christian B., *et al.* A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO J 2000, 19:2304-2314.
66. Dong X. Genetic dissection of systemic acquired resistance. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4:309-314.
67. Douet V., Loiseau L., Barras F., *et al.* Systematic analysis, by the yeast two-hybrid, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of *Erwinia chrysanthemi*. Res Microbiol, 2004, 155(2):71-75.
68. Dow J.M., Feng J.X., Barber C.E., *et al.* Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. Microbiology, 2000, 146:885-891.
69. Dow J.M., Osbourn A.E., Wilson T.J., *et al.* A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. Mol Plant-Microbe Interact, 1995, 8:768-777.
70. Dums F., Dow J.M., Daniels M.J. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other Gram-negative bacteria. Mol Gen Genet, 1991, 229(3):357-364.
71. Dutta R., Qin L., Inouye M. Histidine kinases: Diversity of domain organization. Mol Microbiol, 1999, 34:633-640.
72. Elasri M., Delome S., Lemanceau P., *et al.* Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soil borne *Pseudomonas* spp. Appl Environ Microbiol, 2001, 67:1198-1209.
73. Enard C. and Expert D. Characterization of a *tonB* mutation in *Erwinia chrysanthemi* 3937: TonB<sub>Ech</sub> is a member of the enterobacterial TonB family. Microbiology, 2000, 146:2051-2058.
74. Engelender S., Eyal A., Szargel R., *et al.* Synphilin-1A: an aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death and is present in aggregates from alpha-synucleinopathy patients. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103:5917-22.

75. Escolar L., Van den Ackerveken G., Rossier O. Type III secretion and in planta recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol Plant Pathol*, 2001, 2:287-296.
76. Ezuka A. and Kaku H. A historical review of bacterial blight of rice. *Bull Natl Inst Agrobiol Resour*, 2000, 15:53-54.
77. Feng T.Y. and Guo T.T. Bacterial leaf blight of rice plant. VI. Chemotactic response of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* to water droplets exudated from water pores on the leaf of rice plants. *Bot Bull Acad Sin*, 1975, 16:126-136.
78. Fenselau S. and 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. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8:845-854.
79. Fenselau S., Balbo I., Bonas U. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1992, 5(5):390-396.
80. Flavier A.B., Clough S.J., Denny T.P., *et al.* Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*, 1997, 26(2):251-259.
81. Fuqua C. and Eberhard A. Signal generation in autoinduction systems: synthesis of acylated homoserine lactones by LuxI-type proteins. In Dunny, G.M. and Winans, S.C. (eds). *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. Washington, DC: ASM Press, 1999, 211-230.
82. Fuqua W.C. and Winans S.C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, 1994, 176:2796-2808.
83. Gaudriault S., Brisset M.N., Barny M.A. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new *hrp*-secreted protein. *FEBS Lett*, 1998, 428:224-228.
84. Geert V., Dedeken P., Louw V., *et al.* Plumbism or lead intoxication mimicking an abdominal tumor. *J Gen Intern Med*, 2006, 21(6):C1-3.
85. Genin S., Gough C.L., Boucher C.A., *et al.* Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol*, 1992, 6(20):3065-3076.
86. Goel A.K., Rajagopal L., Nagesh N., *et al.* Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol*, 2002, 184:3539-3548.
87. Goel A.K., Rajagopal L., Sonti R.V. Pigment and virulence deficiencies associated with mutations in the *aroE* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:245-250.
88. Goodier R.I. and Ahmer B.M. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol*, 2001, 183:2249-2258.

89. Goryshin I.Y., Jendrisak J., Hoffman L.M., *et al.* Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol*, 2000, 18:97-100.
90. Goryshin I.Y. and Reznikoff W.S. Tn5 *in vitro* transposition. *J Biol Chem*, 1998, 273:7367-7374.
91. Grimm C., Aufsatz W., Panopoulos N.J. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol*, 1995, 15(1):155-165.
92. Gross D.C. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29:247-278.
93. Gu K.Y., Yang B., Tian D.S., *et al.* R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 2005, 435:1122-1125.
94. Gueneron M., Timmers A.C., Boucher C., *et al.* Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the *hrp*-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*, 2000, 36:261-277.
95. Guilhabert M.R., Hoffman L.M., Mills D.A., *et al.* Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, 14:701-706.
96. Haapa S., Taira S., Savilahti H., *et al.* An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons *in vitro*: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(13):2777-2784.
97. Haas D., Blumer C., Keel C. Biocontrol ability of fluorescent *pseudomonads* genetically dissected: Importance of positive feedback regulation. *Curr Opin Biotech Mol*, 2000, 1:290-297.
98. Hacker J. and Kaper J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54:641-679.
99. Ham C.M. and Deng J.H. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings, *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99:13142-13147.
100. Harding N.E., Rao S., Rainiond A., *et al.* Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. *J Gen Microbiol*, 1993, 139:447-457.
101. Hatterman D.R. and Ries S.M. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology*, 1989, 79:284-289.
102. He S.Y., Huang H.C., Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin<sub>PSS</sub>: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 1993, 73(7):1255-1266.
103. He S.Y. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 1998, 36:363-392.
104. Hensel M., Shea J.E., Gleeson C., *et al.* Simultaneous identification of bacterial virulence genes

- by negative selection. *Science*, 1995, 269(5222):400-403.
105. Herbers K., Conrads-Strauch J., Bonas U. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature*, 1992, 356:172-174.
106. Heurlier K., Denervaud V., Pessi G., *et al.* Negative control of quorum sensing by RpoN( $\sigma^{54}$ ) in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Bacteriol*, 2003, 185:2227-2235.
107. Hienonen E., Roine E., Romantschuk M., *et al.* mRNA stability and the secretion signal of HrpA, a pilin secreted by the type III system in *Pseudomonas syringae*. *Mol Genet Genomics*, 2002, 266(6):973-978.
108. Hirano S.S and Upper C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, icenucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64:624-653.
109. Hirokazu O., Yasuhiro I., Masaru T. Genome Sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Suggests Contribution of Large Numbers of Effector Genes and Insertion Sequences to Its Race Diversity. *JARQ*, 2005, 39 (4):275-287.
110. Hoffman L.M., Jendrisak J.J., Meis R.J., *et al.* Transposome insertional mutagenesis and direct sequencing of microbial genomes. *Genetica*, 2000, 108:19-24.
111. Hopkins C.M., White F.F., Choi S.H., *et al.* Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1992,5(6):451-459.
112. Hrabak E.M and Willis D.K. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol*, 1992, 174:3011-3020.
113. Hu N.T., Hung M.N., Chiou S.J., *et al.* Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol*, 1992, 174(8):2679-2687.
114. Hua S.B., Luo Y., Qiu M., *et al.* Construction of a modular yeast two-hybrid cDNA library from human EST clones for the human genome protein linkage map. *Gene*, 1998, 215(1):143-52.
115. Huynh T.V., Dahlbeck D., Staskawicz B.J., Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science*, 1989, 245(4924):1374-1377.
116. Hwang I., Li P.L., Zhang L., *et al* Tral, a LuxI homolog, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91:4639-4643.
117. Ilueck C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2):379-433.
118. Iyer A.S. and McCouch S.R. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2004, 17:1348-1354.
119. Kamata K., Sakai T., Makino S., *et al.* Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri*. *J Bacteriol*, 1988, 170(6):2480-2484.



120. Kamdar H.V., Kamoun S., Kado C.I. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. J Bacteriol, 1993, 175:2017-2025.
121. Kamoun S. and Kado C.I. Phenotype switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas campestris*. Appl Environ Microbiol, 1990, 56:3855-3860.
122. Kang Y., Liu H., Genin S., et al. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. Mol Microbiol, 2002, 46 (2):427-437.
123. Katzen F., Becker A., Ielmini M.V., et al. New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(1):278-282.
124. Katzen F., Becker A., Zorreguieta A., et al. Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. J Bacteriol, 1996, 178:4313-4318.
125. Kay E., Humair B., Denervaud V., et al. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2006, 188(16):6026-6033.
126. Keen N.T., Boyd C., Henrissat B. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. Mol Plant-Microbe Interact, 1996, 9(7):651-657.
127. Keen N.T., Tamaki S., Kobayashi D., et al. Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. Mol Plant-Microbe Interact, 1990, 3:112-121.
128. Khater L., Alegria M.C., Borin P.F., et al. Identification of the flagellar chaperone FlgN in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by its interaction with hook-associated FlgK. Arch Microbiol, 2007, doi 10.1007/s00203-007-0240-y.
129. Koplín R., Wang G., Hotte B., et al. A 3.9-kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. J Bacteriol, 1993, 175:7786-7792.
130. Koster A., Kuppe H., Gerog J., et al. Cardiovascular surgery without cardiopulmonary bypass in patients with heparin-induced thrombocytopenia type II using anticoagulation with recombinant hirudin. Anesth Analg, 2000, 90(2):292-298.
131. Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene, 1995, 166:175-176.
132. Krylov V.N. Role of horizontal gene transfer by bacteriophages in the origin of pathogenic bacteria. Genetika, 2003, 39:595-620.
133. Kuhnert P., Heyberger-Meyer B., Burnens A.P., et al. Detection of RTX toxin genes in Gram-negative bacteria with a set of specific probes. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:2258-2265.

134. Kumar A., Sunish Kuniar R., Sakthivel N. Compositional difference of the exopolysaccharides produced by the virulent and virulence-deficient strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Curr Microbiol*, 2003, 46(4):251-255
135. Kuo T.T., Lin B.C., Li C.C. Bacterial leaf blight of rice plant III. Phytotoxic polysaccharides produced by *Xanthomonas oryzae*. *Bot Bull Acad Sinica*, 1970, 11:46-54.
136. Lahaye T. and Bonas U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci*, 2001, 6:479-485.
137. Lampe D.J., Churchill M.E., Robertson H.M. A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*. *EMBO J*, 1996, 15 (19):5470-5479.
138. Larsen R.A., Myers P.S., Skare J.T. Identification of TonB homologs in the family Enterobacteriaceae and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes *J Bacteriol*, 1996, 178(5):1363-1373.
139. Laville J., Voisard C., Keel C., *et al.* Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89:1562-1566.
140. Leach J.E. and White F.F. Bacterial avirulence genes. *Annu Rev Phytopathol*, 1996, 34:153-179
141. Leach J.E., White F.F., Rhoads M.L., *et al.* A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1990, 3:238-246.
142. Lecch J.F., Sherwood J., Fulton R.W., *et al.* Comparison of soluble proteins associated with disease resistance induced by bacterial lipopolysaccharide and by viral necrosis. *Physio Plant Pathol*, 1983, 23:377-385.
143. Lee B.M., Park Y.J., Park D.S., *et al.* The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(2):577-586.
144. Lelpi L., Couso R.O., Dankert M.A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol*, 1993, 175(9):2490-2500.
145. Lindgren P.B., Peet R.C., Panopoulos N.J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol*, 1986, 168:512-522.
146. Lindgren P.B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 1997, 35:129-152.
147. Liu H., Kang Y., Genin S., *et al.* Twitching motility of *Raistonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*, 2001, 147:3215-3229.
148. Loprasert S., Sallabhan R., Atichartpongkul S. Characterization of a ferric uptake regulator (*fur*) gene from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* with unusual primary structure, genome

- organization, and expression patterns. *Gene*, 1999, 239(2):251-258.
149. Manning P.A. and Meyer T.F. Type 4 pili: biogenesis, adhesins, protein export and DNA import. Proceedings of a workshop. *Gene*, 1997, 192:1-198.
150. Marcos C.A., Cassia D., Leticia K., *et al.* New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*, 2004, 186(18):6186-6197.
151. Marcos C.A., Diorge P.S., Maxuel O., *et al.* Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*, 2005, 187(7):2315-2325.
152. Marena M., Brito B., Callard D., *et al.* PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol*, 1998, 27:437-453.
153. Marianna Ovadis M., Liu X.G., Gavriel S., *et al.* The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies. *J Bacteriol*, 2004, 186(15):4986-4993.
154. Marois E. and Bonas U. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J*, 2001, 26:523-534.
155. Mastrangelo E., Bollati M., Milani M., *et al.* Structural bases for substrate recognition and activity in Meaban virus nucleoside-2'-O-methyltransferase. *Protein Sci*, 2007, 16(6):1133-45.
156. Matsutani S., Ohtsubo H., Maeda Y., *et al.* Isolation and characterization of IS elements repeated in the bacterial chromosome. *J Mol Biol*, 1987, 196:445-455.
157. Mazurder R.T.J., Phelps N.R., Krieg R.E. Determining chemotactic responses by two subsurface microaerophiles using a simplified capillary assay method. *J Microbiol Methods*, 1999, 37:255-263.
158. Mazzola M., Leach J.E., Nelson R., *et al.* Analysis of the interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and the rice cultivars IR24 and IRBB21. *Phytopathology*, 1994, 84:392-397.
159. Merz A.J., So M., Sheetz M.P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 2000, 407:98-102.
160. Mew T.W. *Xanthomonas oryzae* pathovars on rice: cause of bacterial blight and bacterial leaf streak. In: J.G.Swings and E.L.Civerolo (eds). *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall, 1993, 30-40.
161. Minardi P., Fede A., Mazzucchi U. Protection induced by protein-lipopolysaccharide complexes in tobacco leaves: Role of protected tissue free-space solutes. *J Phytopathol*, 1989, 127(3):211-220.
162. Moens S. and Vanderleyden J. Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol*, 1996, 22:67-100.

163. Mudgett M.B., Chesnokova O., Dahlbeck D., *et al.* Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97:13324-13329.
164. Nakai K. and Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24:3436.
165. Natsch A., Keel C., Pfirter H.A., *et al.* Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 introduced into soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:2553-2560.
166. Neugebauer H., Herrmann C., Kammer W., *et al.* ExbBD-Dependent transport of maltodextrins through the novel *malA* protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 2005, 187(24):8300-8311.
167. Newman M.A., Daniel S.M.J., Dow J.M. Lysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense related gene expression in *Brassica campestris*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8:775-780.
168. Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83(20):7850-7854.
169. Nizan-Koren R., Manulis S., Mor II., *et al.* The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, 16(3):249-60.
170. Noda T., Saito Z., Iwasaki S., *et al.* Isolation and structural elucidation of phytotoxic substances produced by *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Bull Hokuriku Natl Agric Exp*, 1989, 30:105-129.
171. 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.
172. Noel L., Thieme F., Nennstiel D., *et al.* cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol*, 2001, 41:1271-1281.
173. Ojanen-Reuhs T., Kalkkinen N., Westerlund-Wikstrom B., *et al.* Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*, 1997, 179 (4):1280-1290.
174. Oresnik I.J., Twelker S., Hynes M.F. Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65:2833-2840.
175. James P., Halladay J., Craig E.A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 1996, 144:1425-1436.
176. Panopoulos N.J. and Schroth M. Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves by

- Pseudomonas phaseolicola*. Phytopathology, 1974, 64:1389-1397.
177. Parkinson J.S. and Kofoed E.C. Communication modules in bacterial signaling proteins. Annu rev genet, 1992, 26:71-112.
178. Paulsen I.T., Beness A.M., Saier J.M.H. Computerbasedanalyses of the protein constituents of transport systems catalysirigexport of complex carbohydrates in bacteria. Microbiology, 1997 143, 2685-2699.
179. Pernestig A.K., Melefors O., Georgellis D. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. J Boil Chem, 2001, 276:225-231
180. Perraud AL., Ripppe K., Bantscheff M., *et al* Dimerization of signaling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. Biochim Biophys Acta, 2000, 1478:341-354.
181. Pierre-Olivier Vidalain., Mike B., Hui G., *et al*. Increasing specificity in high throughput yeast two-hybrid experiments. Methods, 2004, 32:363-370
182. Pilippe N., Alcaraz J.P., Coursange E., *et al*. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. Plasmid, 2004, 52:246-255.
183. Pollock T.J., Thorne L., Yamazaki M., *et al*. Mechanism of hacitracin resistance in Gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. J Bacteriol, 1994, 176:6229-6237.
184. Preston G., Deng W.I., Eluang C., *et al*. Negative regulation of *hrp* genes in *Psetidoionas syringae* by HrpV. J Bacteriol, 1998, 180(17):4532-4537.
185. Pugsley A.P., Francetic O., Possot O.M., *et al*. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram negative bacteria. Gene, 1997, 192:13-19.
186. Raaijmaker J.M., Welter D.M., Thomashow LS. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natureal environments. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:881-887.
187. Rajeshwari R. and Sonti R.V. Stationary-phase variation due to transposition of novel insertion elements in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. J Bacteriol, 2000, 182:4797-4802.
188. Ramette A., Moenne-Loccoz Y., Defago G. Polymorphism of the polyketide synthase gene *phID* in biocontrol fluorescent *pseudomonads* producing 2,4-diacetylphloroglucinol and comparison of *PhID* with plant polyketide synthases Mol Plant-Microbe Interact, 2001,14(5):639-52.
189. Ray S.K., Rajeshwari R., Sonti R.V., *et al*. A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. Mol Microbiol, 2002, Nov:46(3):637-647.
190. Ray S.K., Rajeshwari R., Sonti R.V. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. 2000, Mol Plant-Microbe Interact, 13:394-401.
191. Reich K.A., Chovan L., Hessler P. Genome scanning in *Haemophilus influenzae* for identification of essential genes. J Bacteriol, 1999, 181(16):4961-4968.
192. Reimmann C., Beyeler M., Latifi A., *et al*. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa*

- PA01 positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol*, 1997, 24(2):309-19.
193. Reimmann C., Valverde C., Kay E., *et al.* Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 2005, 187(1):276-285.
194. Rich J.J., Kinscherf T.G., Willis D.K., *et al.* Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol*, 1994, 176(24):7468-7475.
195. Roberts D.P., Denny T.P., Schel M.A. Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J Bacteriol*, 1988, 170(4):1445-1451
196. Robey M. and Cianciotto P.N. *Legionella pneumophila* *feoAB* Promotes Ferrous Iron Uptake and Intracellular Infection. *Infect Immun*, 2002, 70(10):5659-5669.
197. Robinson V.L., Buckler D.R., Stock A.M. A tale of two components: A novel kinase and a regulatory switch. *Nature Struct Biol*, 2000, 7:626-633
198. Rome E., Raineri D.M., Romantschuk M., *et al.* Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, 11(11):1048-1056.
199. Ronald P. and Leung H. THE RICE GENOME: The most precious things are not jade and pearls. *Science*, 2002, 296:58-59.
200. Rossier O., Van den Ackerveken G., Bonas U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiology*, 2000, 38:828-838.
201. Rossier O., Wengelnik K., Hahn K., *et al.* The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96(16):9368-9373.
202. Ryba-White M., Notteghem J.L., Leach J.E. Comparison of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Africa, North America and Asia by RFLP analysis. *Intl Rice research notes*, 1995, 20:25-26.
203. Sacherer P., Defago G., Haas D. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 15; 116(2):155-60.
204. Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., *et al.* Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 2002, 415(6871):497-502.
205. Salmond G.P. and Reeves P.J. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18(1):7-12
206. Sarniguet A., Kraus J., Henkels M.D., *et al.* The sigma factor  $\sigma^H$  affects antibiotic production and biological activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92:12255-59.
207. Schafer A.A., Tauch W.J., Kalinowski G., *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning

- vectors derived from *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145:69-73.
208. Schell M.A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol*, 2000, 38:263-292.
209. Schmidli-Sacherer P., Keel C., Defago G., *et al.* The global regulator GacA of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is required for suppression of root diseases in dicotyledons but not in Gramineae. *Plant pathol*, 1997, 46(1):80-90.
210. Schulte R. and Bonas U. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino acid. *Plant Cell*, 1992, 4:79-86.
211. Schulte R. and Bonas U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J Bacteriol*, 1992, 174:815-823.
212. Schwyn B. and Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987, 160(1):47-56.
213. Shaw C.H., Ashby A.M., Brown A., *et al.* *virA* and *virG* are the Ti-plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone. *Mol Microbiol*, 1988, 2(3):413-417.
214. Shen Y., Chern M., Silva F., *et al.* Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* flagellar operon region and molecular characterization of *flhF*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, 14:204-213.
215. Shen Y., Sharma P., da Silva F.G., *et al.* The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *raxP* and *raxQ* genes encode an ATP sulfurylase and adenosine-5'-phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity. *Mol Microbiol*, 2002, 44:37-48.
216. Shimizu R., Taguchi F., Marutani M., *et al.* The DeltafliD mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269(1):21-30.
217. Simpson A.J., Reinach F.C., Arruda F., *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*, 2000, 406(6792):151-157.
218. Slater H., Alvarez-Morales A., Barber C.E., *et al.* A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signaling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 2000, 38:986-1003.
219. Song W.Y., Wang G.L., Chen L., *et al.* The rice disease resistance gene, *Xa21*, encodes a receptor-like protein kinase. *Science*, 1995, 270:1804-1806.
220. Souza J.T., Mazzola M., Raaijmakers J.M. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(12):1328-1340.
221. Stephan Heeb and Dieter Hass. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001,

- 14(12):1351-1363.
222. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69:183-215.
223. Stock J.B., Ninfa A.J., Stock A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev*, 1989, 53(4):450-490.
224. Stojiljkovic I., Tsolis R.M., Baumler A.J., *et al.* Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun*, 1996, 64(11):4549-4556.
225. Subramoni S. and Sonti R.V. Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *fur* mutant in rice Leaves is rescued by ascorbic acid supplementation. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2005, 18(7):644-651.
226. Sun Q.H., Hu J., Huang G.X., *et al.* Type-II secretion pathway structural gene xpsE, xylanase- and cellulase secretion and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology*, 2005, 54(1):15-21.
227. Swanson R.V., Alex L.A., Simon M.I. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(11):485-490.
228. Swings J., Vanterin L., Kersters K. The bacterium *Xanthomonas*. In: J.G.Swings and E.L.Civerolo (eds). *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall, 1993, 121-156.
229. Szurek B., Rossier O., Hause G., *et al.* Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol*, 2002, 46(1):13-23.
230. Taguchi F., Shimizu R., Inagaki Y., *et al.* Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(3):342-349.
231. Takeuchi Y., Tohbaru M., Sato A. Polysaccharide in primary cell walls of rice cells in suspension culture. *Phytochemistry*, 1994, 35:262-263.
232. Tang J.L., Feng J.X., Li Q.Q., *et al.* Cloning and characterization of the *rplC* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: involvement in exopolysaccharide production and virulence to rice. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996a, 9(7):664-666.
233. Tang J.L., Liu Y.N., Barber C.E., *et al.* Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet*, 1991, 226(3):409-417.
234. Tang X.Y., Frederick R.D., Zhou J., *et al.* Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, 1996b, 274(5295):2060-2063.
235. Thieme F., Koebnik R., Bekel T., *et al.* Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, 2005, 187(21):7254-66.
236. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap



- penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(22):4673-80.
237. Tsolis R.M., Townsend S.M., Miao E.A., *et al.* Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*, 1999, 67(12):6385-6393.
238. Tsuchiya K., Mew T.W., Wakimoto S. Bacteriological and pathological characteristics of wild types and induced mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathology*, 1982, 72(1):43-46.
239. Tsuge S., Furutani A., Fukunaka R., *et al.* Expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *hrp* Genes in XOM2, a Novel Synthetic Medium. *J Gen Plant Pathol*, 2002, 68:363-371.
240. Van den Ackerveken G., Marois E., Bonas U. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, 1996, 87(7):1307-1316.
241. VandeBroek A. and Vanderleyden J. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1995, 8:800-810.
242. Vasse J., Genin S., Frey P., *et al.* The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13(3):259-267.
243. Vidhyasekaran P., Alvenda M.E., Mew TW. Physiological changes in rice seedlings induced by extracellular polysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Physiol Mol Plant Patholog*, 1989, 35:391-402.
244. Vivian A. and Arnold D.L. Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *J Plant Pathol*, 2000, 82:163-178.
245. Voelker L.L. and Dybvig K. Transposon mutagenesis. *Methods Mol Biol*, 1998, 104:235-238.
246. Von Bodman S.B., Bauer W.D., Coplin D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 2003, 41:455-482.
247. Vorholter F.J., Niehaus K., Puhler A. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. *Mol Genet Genomics*, 2001, 266:79-95.
248. Wall Kaiser. Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol*, 1999, 32: 1-10.
249. 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.
250. Wengelnik K. and Bonas U. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol*. 1996, 178(12):3462-3469.
251. Wengelnik K., Rossier O., Bonas U. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes. *J Bacteriol*, 1999, 181(21):6828-6831.
252. Whistler C.A., Corbell N.A., Samiguet A., *et al.* The two-component regulators GacS and GacA

- influence accumulation of the stationary-phase sigma factor and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J Bacteriol, 1998, 180:6635-6641.
253. Whistler C.A., Koropatnich T.A., Pollack A., *et al.* The GacA global regulator of *Vibrio fischeri* is required for normal host tissue responses that limit subsequent bacterial colonization. Cell Microbiol. 2007, 9(3):766-778.
254. White F.F., Yang B., Johnson L.B. Prospects for understanding avirulence gene function. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3(4):291-298.
255. Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., *et al.* Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev, 2001, 25:365-404.
256. Whitfield C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O-antigens. Trends Microbiol, 1995, 3:178-185.
257. Wiggerich H.G and Alfred Pühler A. The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*). Microbiology, 2000, 146:1053-1060.
258. Winson M.K., Swift S., Fish L., *et al.* Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiol Lett, 1998, 163(2):185-192.
259. Wood D.W., Setubal J.C., Kaul R., *et al.* The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science, 2001, 294(5550):2317-2323.
260. Xiao Y. and Hutcheson S.W. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. J Bacteriol, 1994, 176(10):3089-3091.
261. Xiao Y., lieu S., Yi J., *et al.* Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. J Bacteriol, 1994, 176(4):1025-1036.
262. Xu G.W and Gonzalez C.F. Evaluation of TN4431-induced protease mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* for growth in plants and pathogenicity. Phytopathology, 1989, 79:1210-1215.
263. Yang B., Zhu W.G., White F.F., *et al.* The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97:9807-9812.
264. Yang Y. and Gabriel D.W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. Mol Plant-Microbe Interact, 1995, 8:627-631.
265. Yoshimura S., Yamanouchi U., Katayose Y., *et al.* Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95:1663-1668.
266. Young G.M., Schmiel D.H., Miller V.L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96:6456-6461.

267. Young N.D. The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3:285-290.
268. Young S.A., White F.F., Hopkins C.M., *et al.* Avrxa10 protein is in the cytoplasm of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1994, 7:799-804.
269. Yu J., Hu S., Wang J., *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296(5565):79-92.
270. Zhu W., MaGbanua 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.
271. Zhu W., Yang B., Wills N., *et al.* The C terminus of AvrXa21 can be replaced by the transcriptional activation domain of VP16 from the herpes simplex virus. *Plant Cell*, 1999, 11:1665-1674.
272. Zhu W.G., Yang B., Chittoor J.M., *et al.* AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, 11:824-832.
273. Zou L.F., Wang X.P., Xiang Y., *et al.* Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(9):6212-6224.

## 附录

### 本研究所用菌株、质粒 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strains or plasmids	特 征 Characteristics	来 源 Source
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1</i>	Lab collection
DH5 $\alpha$	$\Phi 80$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>recA1, endA1, thi-1</i>	Lab collection
S17-1( $\lambda$ - <i>pir</i> )	294, <i>recA</i> , chromosomally integrated RP4 derivative, Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Lab collection
<b><i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i></b>		
PXO99 <sup>A</sup>	Philippine race 6 strain, avirulence to rice plants with Xa21	Lab collection
$\Delta$ <i>gacA</i> <sub>oo</sub>	<i>gacA</i> <sub>oo</sub> gene replaced by Gm <sup>R</sup> gene, Gm <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ <i>gacA</i> <sub>oo</sub> ::C	$\Delta$ <i>gacA</i> <sub>oo</sub> complemented with pHrga, Gm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ <i>tdx</i> <sub>oo</sub>	<i>tdx</i> <sub>oo</sub> gene inserted by pKtdr, Kan <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ <i>tdx</i> <sub>oo</sub> ::C	$\Delta$ <i>tdx</i> <sub>oo</sub> complemented with pHtdx <sub>oo</sub> , Kan <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	This study
$\Delta$ <i>gacA</i> <sub>oo</sub> / $\Delta$ <i>tdx</i> <sub>oo</sub>	double mutant in <i>gacA</i> <sub>oo</sub> and <i>tdx</i> <sub>oo</sub> gene, Gm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>		
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 <math>\Delta</math>, gal80 <math>\Delta</math></i>	CLONTECH
<b>Plasmids</b>		
pMD18-T	Amp <sup>R</sup> , <i>ColE1</i> origin, T-vector	TaRaKa
pBBR1MCS-5	GmR, clone vector	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pK18mob	Kan <sup>R</sup> , <i>oriT</i> (RP4), <i>lacZ</i> $\alpha$	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pHM1	Sp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , <i>cos</i> , <i>parA</i> , <i>IncW</i> , derivative of pRI40	Hopkins <i>et al.</i> , 1992
pDS132	Cat <sup>R</sup> , <i>R6K ori</i> , <i>mobRP4</i> , <i>sacB</i>	Philippe <i>et al.</i> , 2004
pRG132	pDS132 with <i>gacA</i> <sub>oo</sub> gene inserted by <i>Gm</i> gene	This study
pHtdx <sub>oo</sub>	pHM1 with <i>tdx</i> <sub>oo</sub> gene	This study
pKtdr	pK18mob with <i>tdx</i> <sub>oo</sub> fragment	This study
pHrga	pHM1 with <i>gacA</i> <sub>oo</sub> gene	This study
pGBKT7	Kan <sup>R</sup> , Express any protein as a GAL4 DNA-BD fusion	CLONTECH
pGADT7-Rec( <i>Sma</i> I -linearized)	Amp <sup>R</sup> , Express any protein as a GAL4 DNA-AD fusion	CLONTECH
pMDR18	pMD18-T with Rga fragment containing <i>gacA</i> <sub>oo</sub>	This study
pMDR19	<i>gacA</i> <sub>oo</sub> replaced the Gentamycin gene in pMDR18	This study
pGBKT7- <i>gacA</i> <sub>oo</sub>	pGBKT7 with <i>gacA</i> <sub>oo</sub> to express the bait protein	This study
pGADT7- <i>tdx</i> <sub>oo</sub>	pGADT7 with <i>tdx</i> <sub>oo</sub> fragment to express the prey protein	This study
pGBKT7- <i>tdx</i> <sub>oo</sub>	pGBKT7 with <i>tdx</i> <sub>oo</sub> fragment to express the baitprotein	This study
pGADT7- <i>gacA</i> <sub>oo</sub>	pGADT7 with <i>gacA</i> <sub>oo</sub> to express the prey protein	This study

## 致 谢

本论文是在我的导师何晨阳研究员的亲切关怀和悉心指导下完成的。他严肃的科学态度，严谨的治学精神，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我。从课题的选择到项目的最终完成，何老师都始终给予我细心的指导和不懈的支持，为我指点迷津，帮助我开拓研究思路，精心点拨、热忱鼓励。三年来，何老师不仅在学业上给我以精心指导，同时还在思想、生活上给我以无微不至的关怀，在此谨向何老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。

本研究的顺利完成离不开吴茂森副研究员的支持和帮助，感谢吴老师在实验以及生活中给予的指导和关心。

感谢冯洁研究员在实验设计方面提出的许多建设性的意见，在生活中也得到了冯老师很多的帮助。尤其是在我困难的时候，是冯老师给予了我支持，同时感谢徐进老师在生活上给予的帮助。

感谢张杰研究员、王锡锋研究员、李世访研究员、赵廷昌研究员在实验开题和中期考核中提出了宝贵的意见和建议。

特别感谢北京工商大学的何聪芬教授，在我大学的时候何老师就从生活上关心我，学术上支持我，特别是到了北京后，在生活上给予了我极大的帮助。

在三年的求学过程中，实验室就是我的家，在这个大家庭里得到了许多同学的帮助，是他们使我在实验之余感到家的温馨。感谢张静、高世强、吴静、傅本重、孙蕾、李广旭、柏亚男、管文静、李磊、姚沁涛、张新建、田峰、王文重、周建波、孟威、刘维振、刘喜梅等同学不同形式的帮助。

感谢我的室友陈林，三年的共同生活我们相处的非常愉快，在生活和学习中有很多默契，能有这么一位朋友感到很高兴。同时感谢罗术东、陈浩涛、乔洪波、谢家建、刘鹏、吴奇、杨伟等同学在学习和生活中给予的关心和帮助。

感谢中国农业科学院研究生院和植物保护研究所有关领导的大力支持！

值此论文完成之际，我还要感谢一个在学术并没有直接帮助我，却时时刻刻影响我、支持我、关心我的人——我的妻子贾宁女士，是她的默默付出才使我有勇气在学术道路上继续探索下去。同时还要感谢我的父母、岳父母以及妹妹，多年来他们始终如一的理解、支持和关心我的生活和学业。

本研究由国家自然科学基金项目(30671353)资助，表示感谢。

最后，再次向多年来所有关心、支持和帮助过我的老师、同学和亲友表示衷心的感谢！

许景芳  
2007 06

## 作者简历

姓 名: 许 景 升                      性 别: 男  
政治面貌: 中共党员                  籍 贯: 河北省安国市  
出生年月: 1976 年 10 月

### 教育背景:

1993.9-1996.7	河北安国中学-高中
1996.9-2000.7	河北师范大学生物系-本科
2000.9-2003.7	河北师范大学生命科学学院-硕士研究生 (中国农科院作物所农业部作物遗传育种重点实验室-硕士论文)
2003.9-2004.9	中国农科院植保所植物病虫害生物学国家重点实验室 客座科研
2004.9-至今	中国农业科学院植物保护研究所-博士研究生

### 博士期间发表文章:

许景升, 徐进, 张争, 张阳, 何礼远, 冯洁, 一步双重 PCR 法检测梨火疫病病原细菌 *Erwinia amylovora*. 农业生物技术学报 (*in press*)

张新建, 许景升, 何晨阳, 用基因芯片技术分析水稻白叶枯病菌侵染过程的基因表达图谱. 植物病理学报, 2005, 35(6)(ZK):164-167.

### 已获专利

ZL 200510064520.X 用于检测梨火疫病病菌的一步双重 PCR 方法 (第二发明人)