

水稻基腐细菌 ExpS 感受蛋白中 Hamp 结构域的敲除及功能分析

杨利平, 谭秀明, 周佳暖, 刘琼光

(华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州, 510642)

摘要:双组分调控系统是细菌中普遍存在和非常保守的一种重要调节机制,研究水稻基腐细菌 *Dickeya zeae* 中双组分信号转导系统及其对致病性的调控具有重要的意义. 本文通过同源重组、标记置换等分子遗传操作方法,成功敲除了水稻基腐病细菌双组分系统感受蛋白 ExpS 中的 Hamp 功能域,获得了 Hamp 功能片段缺失突变株及互补体. 致病性及毒素产生能力测定试验结果表明, Hamp 在 ExpS/ExpA 双组分系统的信号转导途径中起重要作用,调控水稻基腐菌毒素的产生并影响水稻的致病性及烟草的 HR 反应.

关键词:水稻基腐细菌; 感受蛋白 ExpS; Hamp 功能域; 基因敲除; 致病性

中图分类号: S435.111.49

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0048-05

Knock-Out and Functional Analysis of Hamp Domain of ExpS in *Dickeya zeae*

YANG Li-ping, TAN Xiu-ming, ZHOU Jia-nuan, LIU Qiong-guang

(College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two-component signal transduction systems (TCS) is a kind of important regulation mechanism and very conservative in many bacteria. It has great significance for the study of virulence regulation about TCS in *Dickeya zeae*, the pathogen of bacterial foot rot disease in rice. In this study, mutant of Hamp domain (Δ Hamp) from sensor ExpS and its complementary strain were successfully acquired by the way of homologous recombination and marking replacement (gene knock-out). Further investigations of Hamp mutant showed the virulence decreation on rice, reduced HR on tobacco and lower production of toxin. The results indicated that Hamp in ExpS might play an important role in signal transduction between the two-component system ExpS/ExpA and it was required for the virulence regulation in *Dickeya zeae*.

Key words: *Dickeya zeae*; sensor ExpS; Hamp domain; gene knock-out; virulence

由水稻基腐细菌 *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* (现更名为 *Dickeya zeae*) 引起的水稻基腐病是水稻上重要病害之一, 1979 年 Goto 首次在日本报道, 在东南亚一些国家的水稻产区都有发生, 在我国 13 个省区先后报道发生^[1]. 目前关于水稻基腐细菌的致病机制研究较少, 刘琼光等^[2]发现水稻基腐细菌可产生毒素, 该毒素具有抑制水稻种子萌发和使水稻秧苗致萎及烟草细胞快速坏死的作用, 并提出毒素是水稻基腐细菌重要致病因子之一. 然而, 有关该病原

细菌的致病性调控机理目前还不清楚.

植物病原细菌的致病性是由复杂的网络系统所控制的, 其中, 双组分信号转导系统 (Two-component system, 简称 TCS) 是细菌中普遍存在和非常保守的一种重要调节机制. TCS 通常由一个结合在膜上的感受蛋白和细胞质中的反应调节蛋白 (Response regulator, RR) 组成^[3]. 多数 RR 的 N 端氨基酸相对保守, 部分 C 末端也具有同源性. 大部分的 TCS 调控的是特异性基因的表达, TCS 作用对象是那些赋予细

收稿日期: 2010-03-08

作者简介: 杨利平 (1984—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 刘琼光 (1964—), 男, 副教授, E-mail: qgliu@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31071658)

菌具有特殊功能、行为的基因。明确 TCS 信号转导途径,对于深入了解病菌致病调控分子机理,明确作用靶标,更准确、有效地开发新防治技术具有重要的理论和实际意义。我们通过转座子 Tn5 插入突变,发现和鉴定了水稻基腐细菌中 ExpS/ExpA 双组分系统对该病原细菌的致病性和毒素等有重要调节作用(论文未发表),其中组氨酸蛋白激酶 ExpS 含 922 个氨基酸,存在有 5 个结构域,HAMP (Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methy binding proteins, Phosphatases,简称 Hamp) 是其中的一个结构域。本文对 ExpS 结构中 N 端 Hamp 结构域进行了片段缺失和互补体构建,并对其功能进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

PrimerSTAR™ HS DNA Polymerase、Taq DNA Poly-

merase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI、10 kbp DNA Ladder marker、DL2000 DNA Ladder marker,均购自宝生物(大连)有限公司。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α (deoR, recA, endA, hsdR, supE, thi, gyrA, relA) 热击感受态、Universal DNA Purification Kit、Star Prep Plasmid Miniprep Kit,均购自天根生化科技(北京)有限公司。卡那霉素(Kan)、庆大霉素(Gen)、四环素(Tc),购自 Sigma 公司。试验所用的菌株 EC1 为水稻基腐细菌野生型菌株,由华南农业大学资源环境学院细菌研究室提供。质粒 pK18 mob [Kan^R, SacB, lacZa, pMBLori, oriT (RP4)]、pLAFR3 (Mob⁺, Tra⁻, Cosmetic, Tc^R)、pTGN (Gen^R, Tn5, Amp^R, npt, GFP, RP4 oriT/R6KoriV) 和 pRK2013 (Tra⁺, Mob⁻, ColE1-replicon, Kan^R, Spe^R) 由新加坡分子与细胞生物学研究所提供。引物见表 1,由上海英骏基因公司合成。

表 1 试验所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')	酶切位点	在 ExpS 基因位置
ExpS-P1	cggaattcCGCCATAAGTGTGCTGTCATTG	EcoRI	535 ~ 557 bp
ExpS-P4	ccggatccggTGAGCCACTGACTCATTATG	BamHI	3 479 ~ 3 499 bp
Hamp-P2	GTCAATTCGAGAATTGACGCGGGCCATGAACATCTCAC		1 115 ~ 1 132 bp
Hamp-P3	GTCAATTCGAGCGCGTCAAATCATGAGGAAATGCAGCA		1 340 ~ 1 359 bp
Gen-F	GTGAGATGTTTCATGGCCCGCGTCAATTCTCGAATTGAC		
Gen-R	TGCTGCATTTCTCATGATTTGACGCGCTCGAATTGAC		
Hamp-F	gaattcAGCAATACCGTGAGATGTTCA	EcoRI	1 106 ~ 1 127 bp
Hamp-R	ggatCCAGCGTTTCGCGCAGGTCATA	BamHI	1 378 ~ 1 400 bp
Hamp-1	GCGATGCTGTTGCTGTTC		1 132 ~ 1 150 bp
Hamp-2	ATGATAGGCGGTCAGAGA		1 327 ~ 1 345 bp
CX-1	ACAAAGGCGAAAGTCTGGTA		974 ~ 994 bp
CX-2	ATATTCTCCAGCACCAGTTTC		1 662 ~ 1 683 bp

1.2 ExpS 基因上下游片段和 Gen 基因的 PCR 扩增

DNA 提取按常规方法。以 EC1 总 DNA 为模板,用引物 ExpS-P1/Hamp-P2 和 Hamp-P3/ExpS-P4 分别扩增 ExpS 基因(HM215582)的上、下游片段 F1 和 F3。以 pTGN 质粒为模板,用引物 Gen-F/Gen-R 扩增 Gen^R 片段 F2,扩增均采用 PrimeSTAR(tm) HS DNA Polymerase,反应条件:94 ℃ 3 min,98 ℃ 10 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 2 min;共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。用 DNA 纯化试剂盒将 PCR 产物回收,纯化。

1.3 融合产物的获得及打靶载体的构建

参照李敏等^[4]方法,以 F1、F2 和 F3 物质的量比为 1:1:2 混合物 DNA 为模板,用引物 ExpS-P1/ExpS-P4 进行融合 PCR,获得目的片段 F4。反应条件为 94 ℃ 3 min,98 ℃ 10 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 4 min;共 30 个循

环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

将融合产物 F4 连接到 pK18mob 的相应克隆位点,转化 *E. coli* DH5 α ,在 Kan(50 μ g/mL)与 Gen(20 μ g/mL)双抗 LB 培养基上筛选阳性转化子。提取阳性转化子质粒 DNA,获得 ExpS 基因阻断的重组质粒 pK18-Hamp::Gen^R,用 EcoRI 和 BamHI 对重组质粒双酶切鉴定,确认无误,用于后续操作。

1.4 Hamp 片段的无痕敲除及敲除菌株的鉴定

参照 Smith 等^[5]的方法制备 EC1 电击感受态细菌,并完成电转化。取 100 μ L 30 ℃ 下 SOB 液体培养基中培养 2 h 的菌液涂布于双抗 LB(含 100 μ g/mL Kan 和 20 μ g/mL Gen)平板,30 ℃ 下培养 48 h。挑取若干单菌落于 5 mL 液体 LB(含 Gen 20 μ g/mL + w = 5% 蔗糖)培养基中培养 30 ~ 40 h,在此培养过程中

pK18mob 质粒消失,引入片段通过同源臂交换整合到基因组中,完成 Hamp 区域的功能缺失。

取上述各菌落培养液,分别涂布于含 Gen、Kan 的 LB 平板,30 ℃ 下培养 20 ~ 30 h. 仅具 Gen 抗性的菌株为潜在阳性克隆体,以该菌落为模板,用引物 Hamp-F/Hamp-R 扩增检测,以确定 Hamp 是否敲除成功,扩增得到目的片段的菌株命名为 Δ Hamp。

1.5 Hamp 缺失菌株的功能互补

以 EC1 基因组 DNA 为模板,用 Hamp-F/Hamp-R 引物 PCR 扩增 Hamp DNA 片段,并克隆到表达载体 pLAFR3 上,通过三亲杂交,完成 Δ Hamp 的功能互补,并通过 PCR 验证无误,互补成功的菌株命名为 R-Hamp。

1.6 Δ Hamp 菌株表型测定

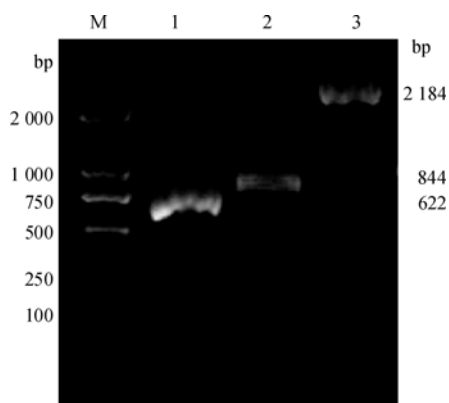
1.6.1 水稻的致病性和烟草的 HR 挑取 EC1、 Δ Hamp 及 R-Hamp 单菌落,接种于 LB 培养液中,32 ℃ 下 180 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{ nm}} = 0.8$ 时,取菌液 300 μL 注射接种水稻(品种:特籼 13)基部和烟草(品种:K326)叶片,24 ~ 48 h 后观察其致病性及过敏性反应(HR)。

1.6.2 毒素生物活性测定 将此 3 个菌株分别接种于 LB 培养基中,32 ℃ 下 180 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{ nm}} = 1.2$ 时,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液(粗毒素)做平板抑菌试验,采用打孔的方法,LB 平板含指示菌 *E. coli* DH5 α ,每孔加入粗毒素 20 μL (设 3 个重复),32 ℃ 培养 24 h,观察抑菌圈大小。

2 结果与分析

2.1 Hamp 侧翼片段扩增及重组质粒的酶切鉴定

以 EC1 总 DNA 为模板,PCR 得到 Hamp 上、下游同源臂序列,大小分别为 622、2 184 bp;以 pTGN 质粒为模板,扩增得到 825 bp 的 Gen^R 抗性基因(图 1)。进一步以 ExpS-P1/ExpS-P4 引物进行融合 PCR,

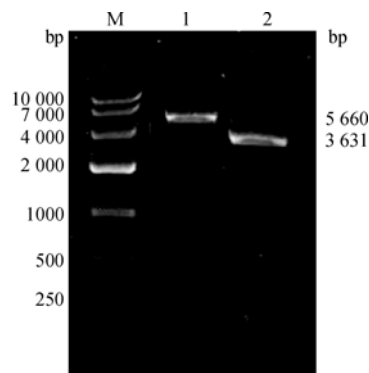


M: DNA marker; 1: Hamp-F1, 2: Hamp-G-F2, 3: Hamp-F3.

图1 Hamp 上、下游同源臂片段 F1、F2、F3 PCR 扩增

Fig. 1 Segments of Hamp upstream and downstream F1, F2, F3 PCR

获得缺失 Hamp 的融合片段,大小为 3 631 bp,与理论值相符(图 2),送上海英骏基因公司测序,结果显示片段连接准确无误。通过酶切、连接等分子操作,将 DNA 片段 F4 连接于质粒 pK18mob,从而获得重组质粒 pK18-Hamp::Gen^R。



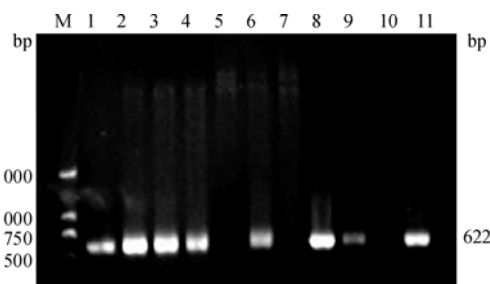
M: DNA marker; 1: pK18mob 质粒, 2: 质粒 F1, F2 和 F3 的融合 PCR 产物 F4

图2 Hamp 缺失的融合片段

Fig. 2 Hamp deletion segment fusion PCR

2.2 Hamp 缺失菌株的构建与分子验证

用引物 ExpS-P1/Hamp-P2 对潜在 Δ Hamp 菌株进行菌落 PCR,扩增得到片段大小为 600 bp 左右的片段(图 3),与理论值吻合。同时,用引物 Hamp-1/Hamp-2 扩增未得到任何条带,表明 Hamp 已被 Gen 片段替换。用引物 CX-1/CX-2 PCR 扩增测序,以确定 Gen 片段与 Hamp 两翼衔接的正确性。测序引物及本研究所用引物在 ExpS 最大开放阅读框中的位置如图 4 所示。



M: DNA marker; 1: 正对照; 2、3、4、6、8、9、11 为 PCR 检测阳性菌落; 5、7、10 为 PCR 检测阴性菌落。

图3 Hamp 缺失菌株的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR confirmation of Hamp mutants

2.3 Hamp 的功能互补

用 Hamp-F/Hamp-R 引物 PCR 扩增经三亲杂交获得单菌落,并分别以 EC1 总 DNA 和 Δ Hamp 的质粒为模板作为阳性和阴性对照。结果(图 5)表明,PCR 扩增出约 303 bp 的 Hamp 目的片段,与理论值相符,而 Δ Hamp 未扩增出任何条带,表明已成功获得了 Δ Hamp 的互补体 R-Hamp。

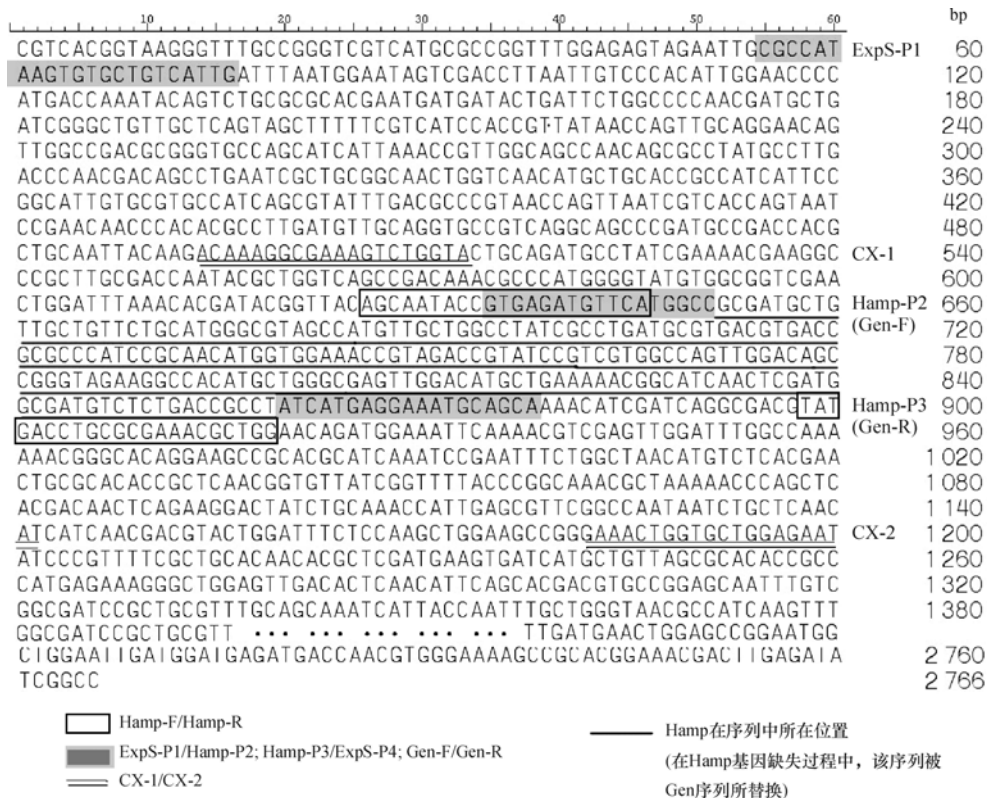


图4 试验所用引物在 ExpS 基因的 ORF 框中分布示意图

Fig. 4 The site of tested primers in the ORF of ExpS gene

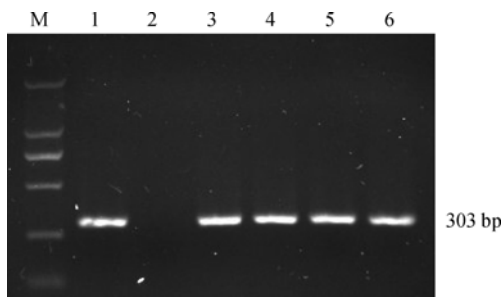
M: DNA marker; 1: EC1; 2: Δ Hamp; 3 ~ 6: R-Hamp.

图5 Hamp 互补体的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of R-Hamp

2.4 Hamp 缺失对水稻致病性和烟草 HR 反应的影响

在烟叶上接种 3 种菌液 2 d 后, 烟草的 HR 反应存在差异: Δ Hamp 较 EC1 在烟草上的过敏性坏死症

状有所下降(图 6), R-Hamp 在烟草上的 HR 反应表型恢复至野生型。

Δ Hamp 菌株接种水稻 48 h 后, 在接种部位无明显症状, 而经 EC1 和 R-Hamp 菌株接种的水稻, 茎基部变褐色, Δ Hamp 在水稻上的致病性减弱(图 6)。Hamp 结构域影响病原细菌在水稻上的致病性和在烟草上的 HR 反应, 表明 Hamp 在水稻基腐细菌 ExpS/ExpA 双组分系统的信号转导过程中具有重要作用。

2.5 Hamp 缺失对细菌毒素产生的影响

抑菌试验结果(图 7)显示: Δ Hamp 完全丧失产生毒素的功能, 无抑菌圈, 而其互补体 R-Hamp 可恢复野生型表型, 表明 Hamp 区域对细菌毒素的产生起重要作用。

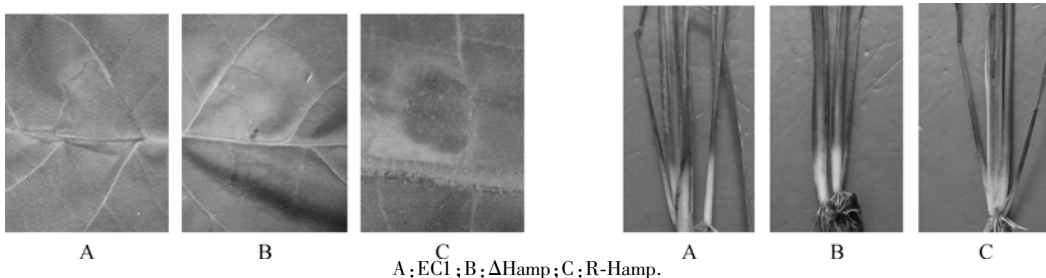
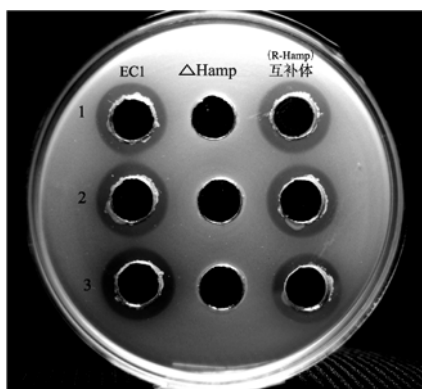


图6 Hamp 缺失对烟草的 HR 反应以及对水稻致病性的影响

Fig. 6 Hypersensitive response on tobacco and the pathogenicity on rice for Hamp mutant



1~3 分别为 3 个重复。

图 7 Hamp 缺失对毒素产生的影响

Fig. 7 Toxin production of Hamp mutant

3 讨论

细菌的双组分调控系统 (TCS) 具有信号传递和基因调节 2 个基本功能,它是细菌学领域研究的热点之一,TCS 在植物病原细菌致病因子调控中发挥着重要作用,如双组分 RpfC/RpfG 系统在细菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 致病性调控中,通过介导群体感应信号 DSF 的信号转导,调控 300 多个基因的表达,包括编码胞外多糖、III 型分泌系统 (Type III secretion system, T3SS) 和胞外酶的基因^[6-8]。在水稻基腐细菌中,我们已经发现了 ExpS/ExpA 双组分系统的存在,克隆了调节蛋白 ExpA 基因,并对 ExpA 调控该病原细菌的致病性、毒素和胞外酶的产生进行了研究。ExpS 是一种组氨酸激酶蛋白 HK,基因序列全长 3 787 bp,其中包括 2 766 bp 的完整开放阅读框 (ORF),编码 922 个氨基酸,富含丙氨酸、组氨酸、天冬氨酸,存在有 5 个结构功能域 (Domain),Hamp 是其中的一个结构域。通过基因敲除方法,获得了 ExpS 中 Hamp 区域的缺失突变体,在此过程中采用融合 PCR 可以更快速、高效地完成基因间的重组。

Hamp 区域缺失的菌株完全丧失了产生毒素的能力,并在寄主水稻上的致病性和烟草上的 HR 反应有所下降。由此表明,Hamp 区域是 ExpS 中的重要组成部分和功能域,它在 ExpS/ExpA 双组分系统的信号转导中起重要作用,ExpS 与 ExpA 组成的双组分系统综合调节水稻基腐细菌毒素的产生和病原细菌的致病性,本研究结果将为深入了解水稻基腐细菌中的 ExpS/ExpA 双组分调控系统及其致病机理提供理论依据。本研究还发现,Hamp 的缺失并未使水稻基腐细菌完全丧失致病力,是否还存在其他蛋白激酶传递的信号,即 ExpS/ExpA 是否存在交叉对话 (Cross-talking) 需要进一步探讨。

致谢:本研究承蒙华南农业大学长江学者讲座教授张炼辉博士指导,特此感谢!

参考文献:

- [1] 刘琼光,张静一,王玉涛,等. 水稻基腐病细菌毒素的遗传特性和产毒相关的分子标记[J]. 微生物学报,2008,48(4):446-451.
- [2] 刘琼光,罗建军,何雪霞,等. 水稻基腐细菌毒素的分离纯化、性质和生物学作用[J]. 微生物学报,2008,48(11):1499-1506.
- [3] 李有志,唐纪良,马庆生. 细菌信号传递:TCS 系统[J]. 广西农业大学学报,1997,16(4):328-330.
- [4] 李敏,杨谦. 一种高效构建同源重组 DNA 片段的方法[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(8):53-58.
- [5] SMITH H E, WISSELINK H J, VECHE U, et al. High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2[J]. Microbiology, 1995, 141(1):181-188.
- [6] HE Ya-wen, NG A Y, XU Min, et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signaling network[J]. Molecular Microbiology, 2007, 64:281-292.
- [7] BEIER D, GROSS R. Regulation of bacterial virulence by two component systems[J]. Current Opinion Microbiology, 2006, 9:143-152.
- [8] HE Ya-wen, XU Min, LIN Kui, et al. Genome scale analysis of DSF region in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59:610-622.
- [9] QI Ming-sheng, SUN Feng-jie, CAETANO-ANOLLÉS G, et al. Comparative genomic and phylogenetic analyses reveal the evolution of the core two-component signal transduction systems in enterobacteria[J]. Neuroendocrinol, 2010, 70:167-180.
- [10] HE Ya-wen, WANG Chao, ZHOU Lian, et al. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(44):33414-33421.
- [11] HAZELBAUER G L, BERG H C, MATSUMURA P. Bacterial motility and signal transduction[J]. Cell, 1993, 73:15-22.
- [12] FREDERICK R D, CHIU J L, BENNETZEN J L, et al. Identification of a pathogenicity locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that encodes a two-component sensor regulator protein[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(3):407-41.
- [13] RONSON C W, NIXON T B, AUSUBEL F M. Conserved domain in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli[J]. Cell, 1987, 49:579-581.

【责任编辑 周志红】