

# 水稻条斑病细菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) Wzt 基因参与 LPS O-抗原合成和影响细菌致病性\*

龙菊英 张佳环 王金生\*\*

南京农业大学, 农业部病虫监测重点开放实验室, 南京 210095

**摘要** ABC-转运系统将同质 O-抗原多糖链从细胞质内膜转运到细胞周质空间合成脂多糖(LPS). 通过功能互补和亚克隆序列分析在 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 的基因组文库中发现了一个 Wzt 基因, 该基因编码产物是运输 O-抗原的 ABC-转运系统的疏水组成部分, 为 ATP-结合蛋白. 为区别基因来源将该基因命名为 Wzt<sub>Xooc</sub>. Wzt<sub>Xooc</sub> 编码一个 35.9 ku 的蛋白质. 通过分析发现, Wzt<sub>Xooc</sub> 与数据库中的其他细菌包括水稻白叶枯病菌的 ABC-转运系统的 ATP 结合蛋白质不同. 在 Wzt<sub>Xooc</sub> 序列中仅发现 ATP-结合蛋白中 4 个保守基序的 3 个, 没有发现 ATP-结合位点 Walker A(ATP/GTP binding site motif A). 通过基因插入突变得得到 Wzt<sub>Xooc</sub> 基因突变体 Mwzt. LPS 分析表明: 由于该基因突变使 O-抗原链不能转运通过细胞质膜, 不能形成完整的 LPS 分子, 突变体菌落表面丧失了产生大量胞外多糖的能力; 突变细菌不产生鞭毛, 丧失了游动性和生物膜形成的能力. 重要的是突变体在水稻上的繁殖能力和致病性明显下降, 证明 Wzt<sub>Xooc</sub> 基因与 LPS 合成及致病性有关.

**关键词** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* ABC 转运系统 LPS 致病性

ABC-转运系统在生物中普遍存在, 参与细胞中蛋白质、多肽、多糖和药物的运输<sup>[1,2]</sup>. 该系统一般包括 3 个组成部分: 膜结合蛋白, 周质结合蛋白和底物结合蛋白. 周质结合蛋白即 ATP 结合蛋白, 是几个蛋白中最保守的; 膜结合蛋白的氨基酸序列几乎没有相似性, 而底物结合蛋白序列的变异程度最大<sup>[3,4]</sup>. 编码这 3 个组分的基因常常位于一个操纵子内. 在许多微生物中, 如小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica* O3), 肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* O1), 大肠杆菌 (*E coli* O9), 海红沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* O16), 霍乱杆菌 (*Vibrio cholerae* O1) 和黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*) 等都发现 ABC-运输系统参与 O-抗原的合成<sup>[5]</sup>. 微生物中的 ABC-运输系统包含亲水和疏水两个蛋白组分: 亲水蛋白组分的特征是有一

个保守的 ATP-结合结构域; 疏水蛋白组分的特征是具有多个转膜结构域.

细菌脂多糖(LPS)O-抗原合成的主要步骤包括 O-抗原多糖的起始合成和多糖重复单元的延伸, O-抗原多糖的转运和聚合以及脂质载体 Und-PP 的再循环. 目前关于 O-抗原合成相关基因的命名方法参照 Reeves 等提出的规则<sup>[6]</sup>. O-抗原运输系统, 根据其延伸特征分为 3 种类型<sup>[7,8]</sup>: 第 1 种发生在合成异质多糖的生物中, O-抗原重复多糖链的延长是在还原端. 单个 O-抗原重复单元在细胞内膜细胞质界面上形成, O-抗原重复单元通过 Wzx(RfbX) 转运到周质空间后, 在周质环境中被 O-抗原聚合酶 Wzy(Rfc) 聚合. 在此系统中, Wzz(Rol) 具有调节抗原链长度的功能. 第 2 种类型发生在合成同质多糖的生物中, O-多糖重复链的延伸是在非还原端.

2005-02-05 收稿, 2005-04-15 收修改稿

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30230240)

\*\* 通信作者, E-mail: wangjsh@hju.edu.cn

O-多糖链的聚合在细胞内膜细胞质的界面上完成, 聚合后的 O-多糖链从细胞质空间由 ABC-转运系统转运到周质空间, 依靠 WaaL(RfaL)聚合酶连接到核心-脂质 A 上. 在此系统中, Wzt 蛋白是 ABC-转运系统的亲水组分, 结合一水解 ATP 为运输系统提供能量. Wzm 蛋白是 ABC-转运系统的疏水组成部分, 在细胞质膜上形成运输 O-抗原的跨膜通道<sup>[9]</sup>. 第 3 类是在 *Salmonella enterica* serovar Borreze 中发现的, 合成多糖链时不需要 wzy 基因, 多糖链的运输也不需要 ABC-转运系统<sup>[6]</sup>.

动物病原细菌中对 ABC-转运系统在 O-抗原多糖侧链合成中的作用已有较多研究, 而在植物病原细菌中研究较少. 在 *X. c. pv. campestris* (Xcc) 中已发现 Wzt 突变体影响 O-抗原多糖侧链的合成, 但对其与致病性的关系尚不清楚<sup>[10]</sup>. Matthyse 等报道 *Agrobacterium tumefaciens* 的 ABC-转运系统组分 PotB 基因的突变会导致细菌在胡萝卜悬浮细胞上的附着能力丧失, 因而影响细菌的毒性<sup>[11]</sup>. Dharmapuri 等在水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo) EPS 缺失突变体的研究中鉴定了 3 个与 LPS 合成有关的遗传位点和一个推测的 ABC-转运因子 (Q84BF4)<sup>[12]</sup>. Patil 等最近在 Xoo 的 12.2kb 毒性位点中鉴定出 6 个基因, 这些基因与 LPS 合成和 O-抗原转运有关<sup>[13]</sup>.

水稻条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*, 简称 Xoo) 是水稻黄单胞条斑病致病变种, 与水稻白叶枯病菌在维管束中生长不同, 在薄壁组织细胞间隙中生长. 我们在研究 Xoo (菌株 RS105) 表

面多糖合成与致病性关系中, 从基因组文库中筛选到一个能互补化学诱变突变体 M12 (EPS Path<sup>-</sup>) 胞外多糖 (exopolysaccharide EPS) 和致病性 (pathogenicity Path) 的阳性克隆 P35. 对其 6.87kb 的亚克隆 p80 进行序列分析后发现左端的一个 ORF 编码与 ABC-运输系统中 ATP-结合蛋白基因具有同源性 (GenBank 登录号: AY542534). 本文报道对该基因的鉴定和系统发生分析, 以及通过缺失突变研究阐明该基因对细菌致病性和有关细胞学性状的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

研究中使用的菌株和质粒见表 1. Xoo 在 Nutrient Broth (NB) 或 Nutrient Agar (NA) (Difco) 培养基中培养, 含利福平 (Rif) 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 温度 28 $^{\circ}\text{C}$ ; 含质粒 pBCSK (-) 的宿主菌用氯霉素 (Cm) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  筛选; PMD-T18 用氨苄青霉素 (Am) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  筛选.

### 1.2 细菌生长曲线和致病性实验

水稻汕优 63 (感细菌性条斑病) 在温度 25—30 $^{\circ}\text{C}$ , 空气相对湿度 80% 温室中生长 80d. 对数生长期的细菌 (Xoo) 稀释至浓度  $1 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{mL}$ , 用无针头注射器渗透接种<sup>[14]</sup>. 接种后第二天起回收细菌, 每天 1 次, 3 个接种点作为一个重复, 重复 3 次. 10d 后记录发病情况.

表 1 研究中所用的菌株和质粒

菌株和质粒	有关特性	来源
<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>		
(RS105)	Rif <sup>R</sup> , 野生型细菌	[15]
M12	RS105 化学诱变突变体, EPS <sup>-</sup> Path <sup>-</sup>	本研究
Mwzt	Cm <sup>R</sup> , 携带氯霉素抗性载体序列整合在野生细菌 RS105 染色体上的 Wzt <sub>Xoo</sub> 基因中	本研究
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F <sup>'</sup> recA, $\Phi$ 80 d lacZ, $\Delta$ M15	Gvibco-BRL 公司
S17-1	294 recA, RP4 derivative, Tp <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>	
质粒		[16]
RS105 基因组文库	40kb 左右片段的基因组 DNA 连接在 pUFR034 上	
pUFR034	IncW, Nm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Mob <sup>+</sup> , Mob(p) LacZa <sup>+</sup> , cos	1)

1) 张学名. 水稻黄单胞 (*Xanthomonas oryzae*) 致病相关基因的研究. 南京农业大学博士学位论文. 1999

续表

菌株和质粒	有关特性	来源
pMD-T18	T-vector	[17]
pBCSK(-)	Cloning vector, Cm <sup>R</sup>	TaKaRa
p80	LPS biosynthesis gene cluster a 6.78 kb segment ligated on pUC18	NCCB
pBCSK::ΔWzt	504 bp central region of Wzt cloned in pBCSK(-)	本研究 本研究

NCCB; The Netherlands Culture Collection of Bacteria

### 1.3 DNA 操作和序列分析

DNA 提取, 限制性酶切, 电泳, DNA 连接, 转化, 筛选, PCR, Southern 杂交等操作参见分子克隆手册<sup>[18]</sup>, 限制酶购自 Takara. 序列特征通过下列网站所提供的在线软件进行分析.

分子量及等电点预测通过 (<http://cn.expasy.org/cgi-bin/protparam>); 亚细胞定位分析通过 (<http://www.psорт.org/psортb/results.pl>); 转膜结构预测通过 ([http://sosui.proteome.bio.tu-at.ac.jp/cgi-bin/adv\\_sosui.cgi](http://sosui.proteome.bio.tu-at.ac.jp/cgi-bin/adv_sosui.cgi)); 同源比较通过 (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/>), (<http://dove.embl-heidelberg.de/cgi/blast2a?>); (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>); 多序列比较和进化树分析通过 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 等相应网站所提供的在线分析软件进行.

### 1.4 缺失突变体的构建

用 PCR 扩增 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因的中心序列 (190-694bp 片段), 引物中添加限制酶切位点 *Hind*III, 引物序列为 5'-CCAAGCTTCGACATCTGGT-GATCG-3' 和, 5'-CCAAGCTTATCAGCGGACTCTG-CAGC-3. 得到的 PCR 产物直接克隆到 PMD-T18, 测序验证后, 回收并连接到 pBCSK(-) 上. 参照文献<sup>[11]</sup>将得到的重组质粒 pBCSK::ΔWzt 转化 *Xooc*. 抗生素 (Cm) 筛选同源重组后的突变体 Mwzt.

### 1.5 LPS 分析

LPS 的提取采用 LPS 提取试剂盒 (iNtRON BIOTECHNOLOGY). Tricine-SDS -PAGE 的浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 16%. 电泳条件: 电压 90 V, 电流 40 mA, 温度 4°C. 参照 Vorhölter

的方法<sup>[10]</sup>银染观察 LPS, 再以 Coomassie Blue 染色检测蛋白污染状况.

### 1.6 细菌鞭毛, 游动性和生物膜形成能力的测定

透射电子显微镜负染观察细菌的鞭毛, 半固体培养基法观察细菌游动性<sup>[12]</sup>. 生物膜形成测定参照文献<sup>[19]</sup>, 将对数生长期的 *Xooc* 稀释 100 倍, 3 mL 稀释液在试管中静置 36—48 h 后倾出, 自来水细流缓缓冲洗管壁 3 次, 结晶紫染色 5 min, 再用水反复缓慢冲洗, 直至无紫色液体出现, 然后对器壁上的紫色进行比较和记录.

## 2 结果与分析

### 2.1 功能互补筛选恢复菌落表型的阳性克隆和亚克隆

通过两亲交配从 *Xooc*(RS105) 基因组文库<sup>[16]</sup> 的 2200 个克隆中筛选到一个能恢复突变体 M12 菌落表型和致病性的阳性克隆 P35. P35 用 *Kpn*I 不完全酶切得到大小约 12.7 kb 片段, 包含两个片段 4 kb 的 pKE 和 8.7 kb 的 pKB 的亚克隆 PK23. 功能互补表明 PK23 也能恢复 M12 的菌落表型和致病性. PK23 经 *Eco*RI 不完全酶切得到一个大小为 6.87 kb 的亚克隆 p80. 序列测定和分析后发现, p80 中包含 7 个开放阅读框 (ORF1-7, 登录号 AY542534), 是与 O-抗原合成和转运有关的基因 (图 1).

### 2.2 序列分析

ORF4 的蛋白质登录号为 AAV67421.1, 含 326 个氨基酸. 通过序列比对发现 ORF4 编码的蛋白质属于 ABC-转运系统的 ATP-结合蛋白. 根据 Reeves 建议的命名法将该基因命名为 *Wzt<sub>Xooc</sub>*. ATP-结合蛋白是一种超级蛋白家族, 在 NCBI(nr)

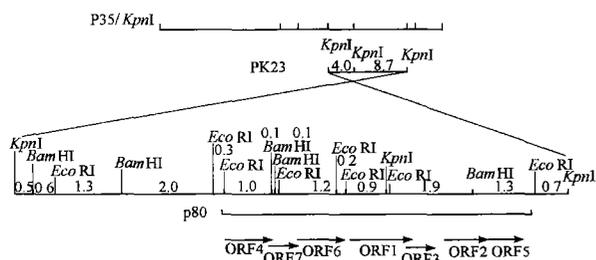


图1 阳性克隆 p35 的限制性酶切图谱和亚克隆 p80 的组织结构

数据库中有 2187473 个蛋白序列与本文报道基因产物具有同源性。根据文献报道这些蛋白质的共同特点是：(1) WalkerA 和 WalkerB 基序形成便于与 ATP 结合的口袋；(2) WalkerA 和 WalkerB 基序之间有一个 ABC 转运家族的标记；(3) 位于 Walker B 基序下游有由 6 个氨基酸组成的 Linton/Higgins 基序<sup>[20]</sup>，基序中组氨酸是保守的，是几个 ABC-转运系统功能所必需的氨基酸<sup>[20-23]</sup>。

图 2 示对其中 12 个序列的 Cluster W 比对， $Wzt_{Xoo}$  包含该类蛋白 4 个保守基序中的 3 个：具有与 ATP-结合功能相关的保守结构域中的 Walker B (ATP/GTP binding site motif B) 位点，ABC-转运家族的标记 (ABC-transporter family signature) 和 Linton/Higgins 基序。但没有发现 Walker A (ATP/GTP binding site motif A)。如图所示，巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 的 ATP-结合蛋白 (蛋白登录号为 Q6QWB3) 与  $Wzt_{Xoo}$  相似，也不具有 Walker A。

有趣的是水稻条斑病菌和水稻白叶枯病菌虽然是水稻黄单胞的两个亲缘关系很近的致病变种 ( $Xoo$  和  $Xoo$ )，但两者 O-抗原 ABC-转运系统的 ATP-结合蛋白却存在较大区别。与水稻条斑病菌的 ATP-结合蛋白不同，水稻白叶枯病菌的 ATP-结合蛋白具有 4 个保守结构域。他们在核苷酸和氨基酸水平上的同源性分别只有 39% 和 60%。甘蓝黑腐病菌 ( $Xcc$ ) 与水稻条斑病菌的同源性更低，分别只有 29% 和 48%。

$Wzt_{Xoo}$  核酸序列的 GC 含量为 56%，低于基因组总体 GC 的含量 (65%)。另外，该蛋白质的分子量为 35.9ku，等电点 (PI) 为 4.97，负电荷氨基酸 (Asp + Glu) 含量为 40%，正电荷氨基酸 (Arg +

Lys) 含量为 27%；蛋白质定位在细胞质上，蛋白质的 44-66 区域氨基酸可能与转膜相关。

### 2.3 缺失突变体的构建和检测

$Wzt_{Xoo}$  基因中一段 504bp 的序列经 PCR 扩增并测序验证后，连接到 pBCSK(-) 的 *Hind*III 位点上 (图 3(a))，得到的重组质粒 pBCSK:: $\Delta Wzt$  通过电转化使 pBCSK:: $\Delta Wzt$  在  $Xoo$ (RS105) 中发生同源重组。同源重组后的突变体重组子即为 RS105  $Wzt_{Xoo}$  的突变体  $Mwzt_{Xoo}$ ，其中  $Wzt_{Xoo}$  基因由于质粒 pBCSK 的插入被中断表达，因为 pBCSK 上多克隆位点的两端均具有启动子，因此该突变是非极性突变。突变体  $Mwzt$  在含氯霉素和利福平双抗 NA 平板上培养后，随机挑选 3 个单菌落株作为可能的突变体，以载体 pBCSK(-) 的序列为探针，对 RS105 和 3 个突变体基因组 *Hind*III 消化产物进行 Southern 杂交检测。结果显示 3 个突变体单菌落株中两个 (1 和 2 号) 出现了很强的杂交信号，说明发生了染色体整合和基因突变，而 3 号突变体菌株几乎没有杂交信号，说明没有突变成功 (图 3(b), (c))。下面的实验除特别指出外，均使用 1 号突变株。

### 2.4 突变菌株 LPS 电泳检测

ABC-转运系统参与 LPS 合成，转运系统突变会造成 LPS 分子结构的变化。本实验分析了野生菌株和 3 个可能突变菌株的 LPS 分子构型。根据 LPS 的结构，电泳后一般会出现两个条带，迁移速度慢且有一定弥散性的是完整 LPS 分子，即脂质 A + 核心多糖 + O-抗原带区，另外一条迁移速率较快的条带是核心多糖 + O-抗原区。在 O-抗原合成受阻的突变体菌株中，往往出现一条迁移速率比核心多糖 + O-抗原更快的条带，这一条带是由于合成 O-抗原链中间产物积累的结果。Tricine-SDS-PAGE 电泳分析的 LPS 分子构型表明，突变体菌株 1 和 2 的脂质 A + 核心多糖 + O-抗原带和核心多糖 + O-抗原带都比野生菌株 RS105 明显减弱，同时多出一条迁移速率更快的条带 (图 4)。这表明基因突变阻断了 O-抗原链与外膜上脂质 A + 核心多糖连接成完整的 LPS 结构。

Q9AEV3	SEFHALQHVSFHVQKGETTIGIIGRNGSGKSTLLQICGTLTPSGGRVAINGRVAALLELG	112
Q62I98	SEFHALQHVSFHVQKGETTIGIIGRNGSGKSTLLQICGTLTPSGGRVAINGRVAALLELG	108
Q69I21	SEFHALQHVSFHVQKGETTIGIIGRNGSGKSTLLQICGTLTPSGGRVAINGRVAALLELG	112
Q6QWB3	-----	
WztXocC	-----	
Q8L351	MQFLALKNVSMDLRKNELGIIIGQNGSGKSTLLQICGTLTPSGGRVAINGRVAALLELG	107
Q84BF4	-EFWALRQVFSIRRGETVGIIGRNGAGKSTLLQWICGTLTPTEGQITVNGRVAALLELG	98
Q7V951	-EHWALRNI SFDLRRGESIGIVGKNGSGKSTLLQLICGTLTPSGGQVYVNGKLAALLELG	105
P72163	-LHWILREVEFTIEPGEAVGIVGVNGAGKSTLLKNIAGTTPTEGQIRVAGRVAALLELG	95
O66231	-LKWILSDINFEVAPGEAVGIVGINGAGKSTLLKLTGTSTPTGTEIYSGRVAALLELG	95
O67181	-ELWVILKGINLEIEKGEVIGVGPNGAGKSTLLKVTGVTGPDKGFVERSGKVVGLLELG	92
Q82X17	KEFWALRQVSEVKKGETTIGIIGRNGSGKSTLLQWICGTLNPTSGSITTYGRVAALLELG	109
Q888F1	KEFWALRQVSEVKKGETTIGIIGRNGSGKSTLLQICGTLTPTEGQITVNGRVAALLELG	107
Q93S83	EEHWVLRNVGFSVAPGESIGIMGRNGAGKSTLLKLTGTSTPTGRTIRHGRVAALLELG	95
Q8PCV1	EEHWVLRNVGFSVAPGESIGIMGRNGAGKSTLLKLTGTSTPTGRTIRHGRVAALLELG	95
Q8PGL6	HNFRALRQVSEVKKGETTIGIIGRNGAGKSTLLQICGTLTPKGTVRIRGRVAALLELG	107
	Site A	
Q9AEV3	AGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	172
Q62I98	AGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	168
Q69I21	AGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	172
Q6QWB3	-----MENIGLSASVGLGSEEQIABRREAILAFADIGDFIDQPVRTYSGMQARLA	51
WztXocC	-----MSASILGLSREQIDSKYDDIVAFADIGDFLEQPVRTYSGMYVRLA	46
Q8L351	AGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	167
Q84BF4	AGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	158
Q7V951	SGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	165
P72163	MGFHPDFGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	155
O66231	MGFHSDFGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	155
O67181	TGFNYELSGLENIYVNASLLGLSRKEIDEKLESTIEFSELDDEINKPLKTYSGMYVRLA	152
Q82X17	SGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	169
Q888F1	SGFNPEFTGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	167
Q93S83	MGFNPDLSGRENARHSAGLNGYITLQIEAVLPEIQEFAEIGDYFDEPVRTYSGMYVRLA	155
Q8PCV1	MGFNPDLSGRENARHSAGLNGYITLQIEAVLPEIQEFAEIGDYFDEPVRTYSGMYVRLA	155
Q8PGL6	AGFNPDFSGRENVMNAALLGLSKAQIEERLDAIFAFADIGGFVDPVKTYSGMYVRLA	167
	. : * * * : : . . . * : : * * * * * :	
	ABC signature	
Q9AEV3	FAVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	231
Q62I98	FAVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	227
Q69I21	FAVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	231
Q6QWB3	FVAIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	110
WztXocC	FAVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	105
Q8L351	FSVIANIDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-SIPFVSHDINAVVNLCTRY	226
Q84BF4	FALLAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	218
Q7V951	PSVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-SLFFVSHDINAVVNLCTRY	224
P72163	PSVATARRPDVLIIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	215
O66231	PSVATAIRPDVLIIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	215
O67181	PSVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	212
Q82X17	FAVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	229
Q888F1	FAVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	227
Q93S83	FAVATAFRPDVLIIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	215
Q8PCV1	FAVATAFRPDVLIIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	215
Q8PGL6	PSVIAHVDADVLVIDEALVGDVAFVQKCMRFLRAFMERG-TVLFVSHDINAVVNLCTRY	227
	* : : : * * * * * * * : : * * : : * * * * * :	
	Site B	
	Linton/Higgins site	

图2 Wzt<sub>XocC</sub>与其他ATP-结合蛋白的同源性比对

Wzt<sub>XocC</sub>为本文报道的蛋白(GenBank AAV67421.1); Q9AEV3来自 *Burkholderia mallei* (AAK27396.1); Q62I98来自 *Burkholderia mallei* ATCC 23344(AAU49979.1); O69I21来自 *Burkholderia pseudomallei* (AAD05459.1); Q6QWB3来自 *Azospirillum brasilense* (AAS83100.1); Q8L351来自 *Vibrio cholerae* O37(AAM22592.1); Q7V951来自 *Prochlorococcus marinus* strain MIT 9313(CAE20283.1); Q84BF4来自 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (AAO20847.1); Q82X17来自 *Nitrosomonas europaea* (CAD84394.1); P72163来自 *Pseudomonas aeruginosa* (AAC16668.1); O67181来自 *Aquifex aeolicus* (AAC07148.1); O66231来自 *Escherichia coli* (BAA28325.1); Q888F1来自 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (AAO54604.1); Q8PCV1来自 *Xanthomonas campestris* (pv. *campestris* Strain ATCC 33913) (AAM39917.1); Q93S83来自 *Xanthomonas campestris* (pv. *campestris* Strain B100) (AAK53481.1); Q8PGL6来自 *Xanthomonas axonopodis* (pv. *citri* Strain 306) (AAM38443.1); \* 代表完全保守的序列, : 代表高度保守的序列, . 代表低水平保守的序列

## 2.5 Wzt 突变体菌落形态, 鞭毛, 游动性, 生物膜 (biofilm) 以及在水稻上的繁殖能力和致病性

突变体 Mwzt 的菌落形态: 与野生型细菌菌落相比, 突变体 Mwzt 的菌落形态与另一种编码糖基转移酶基因(WxocB)的突变体(待发表资料)表现一致, 菌落小而扁平且表面粘质胞外多糖明显减少。表明由于 Wzt<sub>XocC</sub> 基因的突变, 使 ABC-运输系统受

阻, 影响了 O-抗原和胞外多糖的合成(图 5(a))。

突变体 Mwzt 的游动性: Mwzt 的游动能力与野生细菌相比明显下降, 72 h 内只形成直径为 0.6 cm 的菌落, 而野生型细菌的菌落直径可以达到 2—2.3 cm。(图 5(b))。

突变体 Mwzt 的鞭毛合成: 电子显微镜观察表明突变体丧失了合成鞭毛的能力, 而野生型细菌

RS105 能形成典型的单根极生鞭毛(图 5(d)).

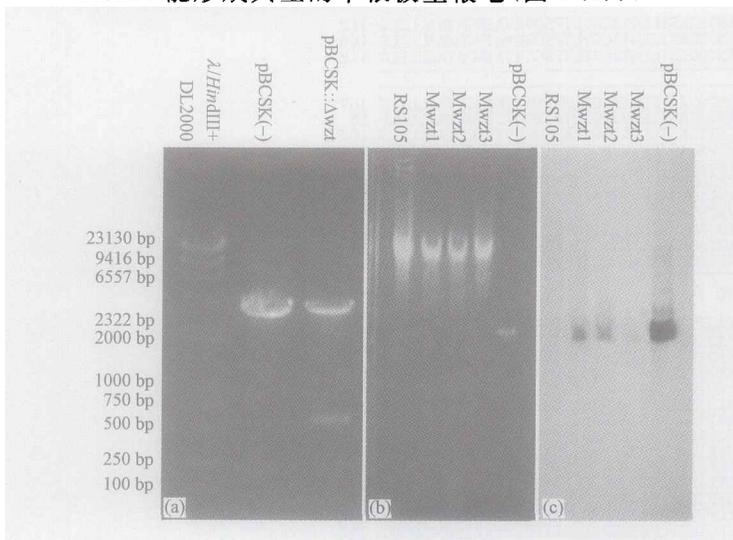


图 3 Wzt<sub>Xoc</sub> 基因突变体的构建和 Southern 杂交检测

(a) 突变单元构件的酶切电泳: 空载体 pBCSK(-)和转化单元 pBCSK::ΔWzt 经 HindIII 消化后电泳; (b) 野生型细菌 (RS105)和突变体候选菌株 1, 2, 3 号基因组和 pBCSK(-) HindIII 酶切电泳; (c) 以 pBCSK(-)为探针, 与野生细菌 RS105 和突变体候选菌株 1, 2, 3 号基因组 Southern 杂交检测

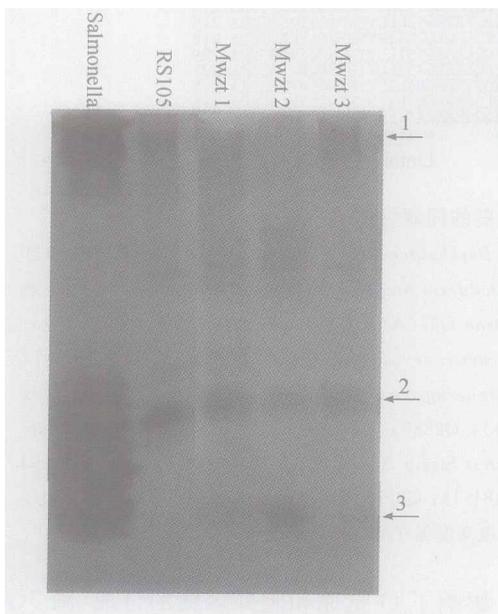


图 4 Wzt<sub>Xoc</sub> 突变体和野生型细菌 (RS105)

LPS 的 SDS-PAGE 电泳分析

箭头 1 所指区域为弥散区, 代表完整的 LPS 结构, 箭头 2 指向脂质 A+核心的条带, 箭头 3 指向 O-抗原中间体积累形成的条带. Salmonella 为 *S. serovar Typhimurium* LPS (Sigma); Mwtz 1 和 Mwtz 2 与 RS105 相比缺少箭头 1 所指弥散带, 多了一条箭头 3 所指向的条带; Mwtz 3 条带特征与 RS105 相似, 参照杂交的结果推测 3 号突变株没有突变成功

突变体 Mwtz 生物膜形成能力: 通过结晶紫染色观察, 野生型细菌 RS105 在试管壁上附着大量的个体, 形成了比较致密的一层由细菌组成的膜. 而突变体则没有发现有细菌附着(图 5(e)).

突变体 Mwtz 在水稻中的繁殖能力和致病性变化: 在温室条件下接种 10 d 后野生细菌在接种点周围形成典型的水浸状病斑, 而突变体只能形成少数水浸状斑点(图 5(c)). 在接种后从接种点回收细菌的实验结果显示, 第 3 天野生菌 RS105 在每克叶片上的细菌数可达 10<sup>8</sup> cfu, 此后数量保持上升, 5 d 后达到 10<sup>10</sup> cfu; 而 Mwtz 的数量最高是在第 4 天, 达到 10<sup>8</sup> cfu, 此后群体数量开始下降(图 5(f)).

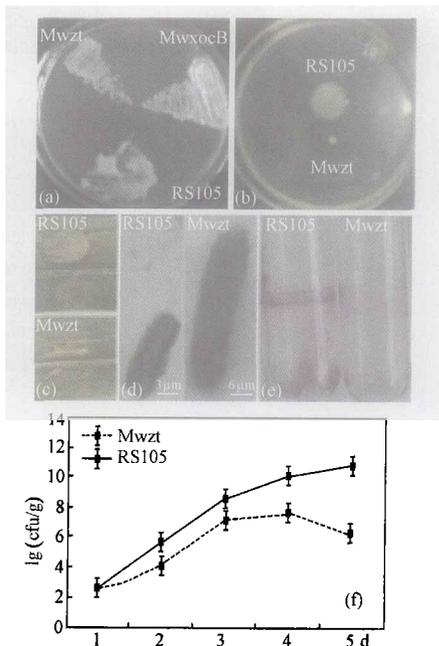


图 5 Wzt<sub>Xoc</sub> 突变体的菌落形态, 鞭毛, 游动性, 生物膜形成和在水稻上的繁殖能力

(a) 菌落形态; (b) 细菌的游动性; (c) 致病能力测试; (d) 鞭毛观察; (e) 生物膜形成能力的定性观察; (f) 在水稻上繁殖能力的测定

3 讨论

本研究报道了水稻条纹病菌参与 O-抗原合成的 ABC-转运系统组分 Wzt<sub>Xoc</sub> 基因. 我们的实验表明 Wzt<sub>Xoc</sub> 基因突变可以造成细菌的多种表型变化. Wzt<sub>Xoc</sub> 基因突变对 LPS 和 EPS 合成都有影响, 丧失鞭毛, 细菌失去游动性, 生物膜不能形成, 在水稻上繁殖能力下降和毒性降低.

### 3.1 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因对水稻条斑病菌 LPS 和 EPS 合成的影响

LPS 是细菌细胞外膜上的重要组分, 在维持细胞结构中起重要作用. 在植物病原细菌中 LPS O-抗原侧链的合成常常与 EPS 合成相关联<sup>[10,13]</sup>. ABC-转运系统对 EPS 和 O-抗原合成的影响已在不同细菌中分别有所报道<sup>[2,5,6,10-13,23,24]</sup>. *Wzt* 基因作为 ABC-转运系统的一个亲水组分, 为运输 O-抗原和 EPS 到细胞质外组装提供能量进而释放 O-抗原载体 Und-p<sup>[9,25]</sup>. 根据 LPS 电泳分析, *Mwzt* 合成脂质 A+核心多糖+O-抗原和核心多糖+O-抗原的能力都有明显减弱, 同时 O-抗原链中间产物累积. 这与甘蓝黑腐黄单胞(*Xcc*)*Wzt* 突变体的 LPS 电泳图像基本一致<sup>[10]</sup>. 在 *Klebsiella pneumoniae* 血清型 O1 O-抗原转运系统的缺失研究中有类似报道<sup>[24]</sup>. 但是在 Vorhölter 等的研究中显示造成 EPS 合成减少的突变体均为第 1 组的糖基转移酶基因(*wxcE*, *wxcD*)的突变, 而 *Wzt* 基因突变是否影响 EPS 合成尚不明确<sup>[10]</sup>. 由于 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 突变体的 LPS 和菌落形态都发生了明显变化, 我们推测在水稻条斑病细菌中 EPS 和 LPS 的合成可能共用了一个转运系统或载体. 根据 *Xcc* 黄原胶合成的遗传调控研究, 发现在一个启动子控制下的 12 个开放阅读框中有几种基因(*gumD*, *gumH*, *gumI*, *gumK*, *gumM*, *gumL*, *gumF* 和 *gumG*)参与糖基和非糖基物质及运输载体的合成, 另外几个基因

(*gumB*, *gumC* 和 *gumE*, *gumJ*)可能与 Xanthan 多聚物形成和细胞膜转运有关<sup>[25,26]</sup>. *Xooc* EPS 的合成和运输是否也涉及这么多的基因尚需进一步研究.

### 3.2 水稻条斑病细菌与有关细菌 *Wzt* 基因的变异分析

最近, Patil 报道了水稻白叶枯病菌 (*Xoo*) 12.2 kb 的一个基因簇, 包含 6 个与 LPS 组装和转运有关的基因<sup>[13]</sup>. 由于这一区域不典型的 G+C 含量和特殊的密码子而构成了基因组岛标志. 该基因组岛在 *Xoo* 菌株中有明显变化, 而且与 *Xooc* 中的有关区域完全不同, 说明 *lps* 基因也是高度变异的<sup>[27]</sup>. 在 *P. aeruginosa* 中的两个基因 *Wzt* 和 *wzm* 发生突变不仅造成 A-Band O-抗原在细胞质内的积累, 而且还造成 B-Band O-抗原的分子重排<sup>[4]</sup>. 本文从 6.87 kb 的亚克隆 P80 中鉴定出含 7 个基因的 *lps* 基因簇, 其最左端是 *Wzt<sub>Xooc</sub>*, 因此很可能在邻近还有一个 *wzm*. 根据亚克隆 P80 序列和最近报道的 *Xoo* 中 12.2 kb 序列的比对, 除在 *wzm* 位点的 164 个核苷酸序列 (AY542534, 93-256; AF337647, 11427-11264) 有 75% 的一致性外, 没有发现其他同源基因. 根据多重序列比对构建的系统发生树推测这两个分类关系相近细菌的 *Wzt* 基因也没有密切关系, 可能具有不同的系统发生(图 6).

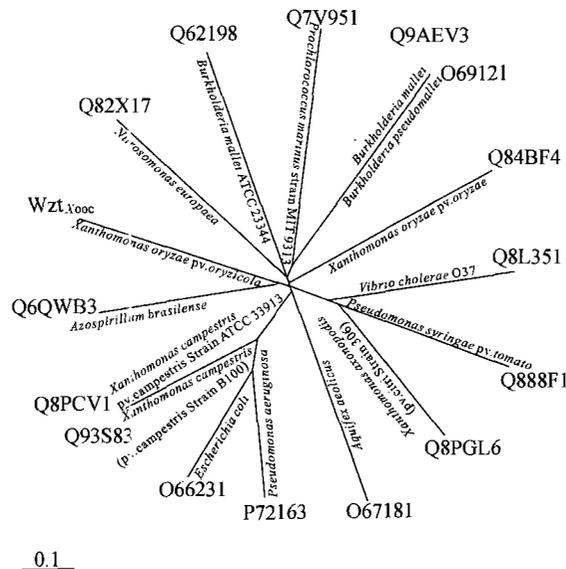


图 6 部分细菌 ABC-转运系统基因 *Wzt* 的系统发生树

图中黑体字代码为蛋白登录号, 进化树用在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) NJ(Neighbour Joining) 方法构建

在系统发生上,不同植物病原细菌的 *Wzt* 基因可能被聚类在不同的组中,水稻条斑病菌与巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)的 *Wzt* 基因(蛋白登录号为 Q6QWB3)关系更为密切.另外, *Xooc* 的 p80 6.87 kb 片段的 G+C 含量为 56%,而 *Xoo* 中 12.2 kb 的 G+C 含量为 50%.说明这两种细菌在 LPS 合成中糖基转移酶和转运系统都是高度专一的, LPS 基因簇内基因的组织存在明显变异.

*Wzt* 基因编码的蛋白一般有 4 个保守基序,但 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 与 *Azospirillum brasilense* (Q6QWB3) 一样只有 3 个,比报道的 *Wzt<sub>Xooc</sub>* (Q84BF4) 少一个.但已报道的 ABC-结合蛋白 Rv1667c (*Mycobacterium tuberculosis*) 也不具有 Walker A 位点.然而,在该蛋白上游的另一个蛋白(Rv1668c)除含 ABC-结合蛋白的全套基序外,还多出一个 Walker A 位点<sup>[28]</sup>.在 *Xooc* 的 *lps* 基因簇中是否也有这一现象还不清楚.

### 3.3 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因突变导致的多种细胞结构和生物功能的改变

由于 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因突变影响了 LPS 合成,可以导致多种细胞结构和生物功能的改变.首先, LPS 分子层作为鞭毛钩状体 L-环着生的位置和鞭毛纤丝合成的基础, LPS 缺失也会影响鞭毛的形成<sup>[29]</sup>.长期以来,细菌运动能力的丧失和自凝现象都报道与 LPS 合成缺陷有关<sup>[30]</sup>.鞭毛在致病性中的作用,不仅在于决定细菌的运动,而且影响生物膜形成<sup>[31]</sup>.生物膜是有高度组织的细菌群体,它改变了单一细菌个体的生理特性和生存状态,同时提高了细菌在寄主表面的附着和定殖能力,提高抵抗环境和寄主防卫反应能力以及对寄主的致病性<sup>[32-34]</sup>.已有的研究表明, *Pseudomonas* 细菌通过表面组分(EPS 和 LPS)与寄主或其他表面物质的静电互作,影响生物膜形成和在基质上的附着<sup>[35,36]</sup>.因此, *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因突变造成的 EPS 和 O-抗原和鞭毛缺失都可能是导致生物膜形成能力丧失的原因. *PotB* 基因作为 *Agrobacterium tumefaciens* 的一种 ABC-转运系统组分,突变后不仅丧失了其在胡萝卜悬浮细胞上的附着能力,同时也使细菌失去毒性<sup>[37]</sup>. He 的研究认为鞭毛与 *Xooc* 的侵染有关而与毒性无关<sup>[38]</sup>.本研究发现失去鞭毛的 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因突变体虽然几乎

完全丧失了生物膜形成能力,但仍具有一定的毒性.这一研究结果可能与本研究所用的强迫渗透接种方法有关.由于 *Wzt<sub>Xooc</sub>* 基因突变体失去鞭毛后仍有一定致病性,我们推测 *Xooc* 的鞭毛可能与毒性或毒素分泌功能没有密切关系. *Wzt<sub>Xooc</sub>* 突变体致病性减弱的原因可能是与 EPS 和 O-抗原所构成的屏障缺陷或不能够形成生物膜使细菌对植物防卫反应敏感,导致繁殖能力下降有关.

### 参 考 文 献

- Higgins C F. ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 1992, 8: 67-113
- Fath M J, Kolter R. ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 995-1017
- Tam R, Saier M H Jr. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 320-346
- Saurin W, Dassa E. Sequence relationships between integral inner membrane proteins of binding protein-dependent transport systems: Evolution by recurrent gene duplications. *Protein Sci*. 1994, 3: 325-344
- Rocchetta H, Lamm J S. Identification and functional characterization of an ABC transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1997, 179: 4713-4724
- Reeves P R, Hobbs M, Valvano M A, et al. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol*, 1996, 4: 495-503
- Keenleyside W J, Whitfield C. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J Biol Chem*, 1996, 271: 28581-28592
- Whitfield C. Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol*, 1995, 3: 178-185
- Valvano M A. Export of O-specific lipopolysaccharide. *Frontiers in Bioscience*, 2003, (8s): 452-471
- Vorholter F J, Niehaus K, Pühler 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 Gen Geno*. 2001, 266(1): 79-95
- Matthysse A G, Yarnall H A, Young N. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1996, 178: 5302-5308
- Klement Z, Rudolph K, Sands D C (eds). *Methods in Phyto-bacteriology*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990
- Patil P B, Ramesh V S. Variation suggestive of horizontal gene

- transfer at a lipopolysaccharide (lps) biosynthetic locus in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen of rice. *BMC Microbiology*, 2004, 4: 40
- 14 Reimers P J, Leach J E. Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene Xa-10 in rice *oryza sativa* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1991, 38: 39—55
  - 15 Ji G H, Kong F M, Shen X P, et al. Preliminary analysis of DNA polymorphism of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and *Xanthomonas leersiae* by using RAPD. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1999, 29(2): 120—125
  - 16 Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology*, 1983, 1: 784—791
  - 17 DeFeyer R, Kado C I, Gabriel D W. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene*, 1990, 88: 65—72
  - 18 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
  - 19 Pittsa B, Martin A, Hamiltonb, et al. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54: 269—276
  - 20 Linton K J, Higgins C F. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 1998, 28: 5—13
  - 21 Walker J E, Saraste M, Runswick M J, et al. Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase. myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1982, 1: 945—951
  - 22 Higgins C F, Gallagher M P, Mimmak M L, et al. A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *BioEssays*, 1988, 8: 111—116
  - 23 Davidson A L, Sharma S. Mutation of a single MalK subunit impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997, 179: 5458—5464
  - 24 Bronner D, Clarke B R, Whitfield C. Identification of an ATP-binding cassette transport system required for translocation of lipopolysaccharide O-antigen side-chains across the cytoplasmic membrane of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *Mol Microbiol*, 1994, 14: 505—519
  - 25 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
  - 26 Vanderslice R W, Doherty D W, Capage M A, et al. Genetic engineering of polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. In: *Recent Development in Industrial Polysaccharides: Biomedical and Biotechnological Advances*. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1989, 145—156
  - 27 Reeves P P, Wang L. Genomic organization of LPS-specific loci. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 264: 109—135
  - 28 Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24: 449—467
  - 29 Olga A, Soutourina A, Philippe N. Bertin regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 790: 1—19
  - 30 Hörte B, Rath-Arnold I, Pühler A, et al. Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol*, 1990, 172: 2804—2807
  - 31 Kirov S M. Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 224: 151—159
  - 32 Sauer K, Camper A K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in Response to surface-associated growth. *J Bacteriol*, 2001, 183: 6579—6589
  - 33 Whiteley M, Bangera M G, Bumgarner R E, et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 2001, 413: 860—864
  - 34 Drenkard E, Ausubel F. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 2002, 416: 740—743
  - 35 Williams V, Fletcher M. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 100—104
  - 36 van Loosdrecht M C M, Lyklema J, Norde W, et al. Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb Ecol*, 1989, 17: 1—6
  - 37 Matthyse A G, Yarnall H A, Young N. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 1996, 178: 5302—5308
  - 38 He S Y, Jin Q L. The Hrp pilus: Learning from flagella. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6: 15—19