

野油菜黄单胞菌野油菜致病变种中一个与 EPS 合成有关的新基因的鉴定

陆光涛^{1,2} 唐纪良^{2*} 何勇强² 陈保善² 唐东阶²

¹(浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029)

²(广西大学分子遗传研究所, 南宁 530005)

摘 要 利用转座子 Tn5 *gus* A5 对野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 简称 *Xcc*) 野生型菌株 8004 进行诱变, 分离到一批胞外多糖 (EPS) 合成减少的突变体。采用 TAIL-PCR (thermal asymmetric inter-laced PCR) 分析突变体的 Tn5 *gus* A5 插入位点, 发现其中一株编号为 151D09 的突变体的插入位点位于 *Xcc* 8004 菌株的基因组编号为 XC3695 的 ORF 内, 该 ORF 功能尚未见报道。序列分析表明, 该 ORF 演绎的编码产物与 *Serratia marcescens* 的 *kdtX* 基因和 *Klebsiella pneumoniae* 的 *waaE* 基因演绎的编码产物分别具有 52% 和 50% 的相似性, 并具有第 2 家族糖基转移酶的功能域, 因此暂将该 ORF 命名为 *waxE* 基因。用同源双交换方法构建了 *waxE* 基因的缺失突变体, 并采用 PCR 和 Southern 杂交的方法对突变体进行了验证。*waxE* 基因缺失突变体在营养丰富培养基的生长繁殖不受影响, 但其 EPS 产量与野生型菌株 8004 相比, 降低 35% 左右, 并且一段 PCR 合成的包含 *waxE* 基因的 DNA 片段能反式互补 *waxE* 基因缺失突变体, 恢复缺失突变体的 EPS 产量, 表明 *Xcc waxE* 基因与 EPS 的生物合成有关。

关键词 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种, 胞外多糖, *waxE* 基因

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0661-07

野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 简称 *Xcc*) 是十字花科植物一种重要病原菌^[1], 它所产生的胞外多糖 (Extracellular polysaccharide, EPS) 又称黄原胶 (Xanthan gum), 具有独特的流变性、良好的水溶性、对各种盐类良好的相容性以及耐酸、碱、热稳定, 在石油、食品、纺织等多个行业用作增稠剂、乳化剂、稳定剂等^[2,3]。

Xcc 的 EPS 的生物合成包括五个阶段: 1. 将单糖分子转化为糖核苷等衍生物前体; 2. 将五糖亚基顺序组装到细胞内膜的多聚异二烯醇脂载体上, 形成五糖重复单位; 3. 甘露糖残基的乙酰化和丙酮酰化; 4. 五糖重复单位的聚合; 5. 聚合物的分泌^[4-7]。目前已知染色体的 *xps* III, *xps* IV, *xps* VI 区域和一个 35.3kb 基因簇的基因编码产物与糖核苷等衍生物前体的形成有关^[8,9], 而 *xps* I 区域即 *gum* 基因簇编码产物与“五糖单元”的顺序性组装、残基修饰、重复单元间的聚合以及 EPS 的分泌有关^[10-12]。

EPS 产量除了受培养基组分及培养条件影响

外, 目前已知 *rpf*、*clp*、*pigB* 等基因能正向或负向调控其生物合成^[13-17]。

本项研究利用转座子 Tn5 *gus* A5 对 *Xcc* 野生型菌株 8004 进行大规模诱变, 分离到一批 EPS 合成减少 (EPS) 的突变体。采用 TAIL-PCR 分析转座子插入位点, 发现一株编号为 151D09 的突变体的 Tn5 *gus* A5 插在 *Xcc* 8004 菌株的基因组编号为 XC3695 的 ORF 内, 该 ORF 也存在于另一已完成全基因组测序的 *Xcc* ATCC33913 菌株的基因组中 (编号为 XCC3744, GI 21115021), 但功能尚未见报道, 只是根据同源比较预测其功能可能与脂多糖的核心区糖链合成有关^[18]。对 8004 菌株的 ORF3695 的序列分析表明, 该 ORF 与可能编码糖基转移酶的粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) *kdtX* 基因和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) *waaE* 基因在氨基酸水平上分别具有 52% 和 50% 的相似性, 并且该 ORF 演绎的编码产物具有第 2 家族糖基转移酶的功能域, 表明该 ORF 可能编码一个糖基转移酶, 因此暂将该

ORF 命名为 *waxE* 基因。通过同源双交换方法对 *waxE* 基因进行缺失,获得的 *waxE* 基因缺失突变体 8976 的 EPS 产量较野生型菌株 8004 下降约 35%,并且体外合成的一段包含 *waxE* 基因的 DNA 片段能反式互补突变体 8976,恢复其 EPS 的合成能力。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件

所用菌株为 *Xcc* 野生型菌株 8004、*Xcc* 8004 的 *waxE* 基因的 Tn5 *gusA5* 插入突变体 151D09 和 *waxE* 基因缺失突变体 8976,大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、ED8767 和 JM109 菌株。培养基及培养条件参照文献[19],抗菌素用法及用量为:四环素(Tc)5 μ g/mL、卡那霉素(Km)25 μ g/mL、氨苄青霉素(Amp)75 μ g/mL、壮观霉素(Spc)50 μ g/mL、利福平(Rif)50 μ g/mL、庆大霉素(Gm)5 μ g/mL。

1.2 *Xcc* 的转座子诱变

将 DH5 α /pLAFR1::Tn5 *gusA5*、8004、ED8767/pRK2073 的细胞以 2:2:1 的比例混合进行三亲本接合,得到接合子 8004/pLAFR1::Tn5 *gusA5*,然后将 8004/pLAFR1::Tn5 *gusA5* 和 8258/pPH1JI 以 1:1 的比例混合进行二亲本接合,将一个与质粒 pLAFR1::Tn5 *gusA5* 不相容的质粒 pPH1JI 导入接合子 8004/pLAFR1::Tn5 *gusA5* 细胞内,以将质粒 pLAFR1::Tn5 *gusA5* 赶出细胞,然后在含 Spe、Gm、Rif、Km 的 NYGA 平板选择 8004 的 Tn5 *gusA5* 突变体。野油菜黄单胞菌致病变种之间或与大肠杆菌之间的三亲本接合,二亲本接合按照 Turner 等所述方法[19]进行。

1.3 Tn5 *gusA5* 插入位点的定位

采用 TAIL-PCR 方法分析突变体的 Tn5 *gusA5* 在 *Xcc* 8004 菌株的基因组的插入位点,具体方法参考文献[20],长引物为根据 Tn5 *gusA5* 的 IS50R 右末端的序列设计的 3 个向外的特异性嵌套引物,短引物为随机简并引物。

1.4 基因操作与重组质粒的构建

质粒 DNA 的碱裂解法提取参考文献[21],细菌总 DNA 的快速提取参考文献[22],限制酶酶切、DNA 的连接转化、Southern 杂交按 Sambrook 方法[23]或厂家提供的方法进行。限制性内切酶,T4 连接酶,Pfu 聚合酶,DNA 同位素标记试剂盒等购自 pro-mega 公司,其它生化试剂购自上海生工公司。

构建用于同源双交换的重组质粒。以 K1、K2 (K1、K2 分别加上 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点)为引物,质粒 pLAFR1::Tn5 *gusA5* 为模板,以 95 $^{\circ}$ C 预变

性 4 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 复性 30 s,74 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环,最后 74 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 的条件下进行 PCR 反应,获得卡那霉素(Km)抗性基因 *kan* 的同源片段,产物纯化后经 *Kpn* I/*Xba* I 双酶切连接到经同样酶切的 pGEM-3Z(+),获得重组质粒 pGET943。分别以 L7、L8 (L7、L8 别加上 *Eco*R I 和 *Kpn* I 酶切位点)和 R7、R8 (R7、R8 分别加上 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切位点)为引物,8004 总 DNA 为模板,以 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 复性 30 s,74 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环,74 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 的条件扩增得到 *waxE* 基因上下游同源片段。上下游同源片段依次连接到 pGET943 的 *kan* 基因上游和下游位置,得到一个 *waxE* 基因被 *kan* 基因所替换的重组质粒 pGET8976,重组质粒 pGET8976 经 *Eco*R I 酶切线性化后,连接到一个能在 *Xcc* 细胞中稳定复制的质粒 pLAFR3,得到重组质粒 pLAT8976,将 pLAT8976 通过电脉冲转化到 *E. coli* JM109 的细胞内。

构建用于互补试验的重组质粒。根据 *waxE* 基因起始密码子上游和终止密码子下游序列设计引物 F7、F8,以扩增完整的 *waxE* 基因。为方便克隆,F7、F8 分别加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。以 F7、F8 为引物,8004 总 DNA 为模板,以 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 复性 30 s,74 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环,74 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 的条件扩增得到一段包含 *waxE* 基因的约 1.5kb 片段,该片段经测序验证后,克隆到 pLAFR3,得到重组质粒 pLATC8976,将 pLATC8976 通过电脉冲转化到 *E. coli* JM109 的细胞内。

PCR 引物及序列见表 1,由上海生工公司合成,PCR 反应在 PE9600PCR 仪上进行,PCR 产物的纯化采用华舜公司的 DNA 纯化试剂盒。

1.5 胞外多糖的检测

对 EPS 的产量进行定性比较,参考文献[14],对 EPS 产量作定量分析时,将 *Xcc* 的过夜培养物以 1% 的接种量接种至加 2% 葡萄糖的 NYGB 培养基,28 $^{\circ}$ C 摇床培养 3~5 d 后,取适量的培养物离心取上清液,将上清液缓慢注入到 5 倍的无水乙醇中,边注入边搅拌,然后将絮状沉淀物取出后干燥,称重,换算成每 100 mL 培养液含 EPS 的重量来进行菌株间的 EPS 产量比较。

1.6 脂多糖(LPS)的分析

采用全细胞裂解法提取 LPS,以 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳和银染法对 LPS 进行分析,具体方法参考文献[24]。

1.7 DNA 和蛋白质序列分析

使用的数据库为 *Xcc* 8004 全基因组序列数据库(广西大学、中国科学院微生物研究所、上海南方人类基因组研究中心共同完成,未发表资料) GenBank 的 Database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 同源比较的分析软件为 BLAST 和 NTI6.0 vector。蛋

白质分子量和等电点的预测在 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam> 进行,蛋白质功能域分析在 <http://smart.embl-heidelberg.de> 进行。

1.8 *waxE* 基因的基因库序列号

本文的 *waxE* 基因的序列已提交至 GenBank, 序列号为 AY329625。

表 1 本工作所用的引物

Table 1 Primers used in this work

Primer	Primer sequence	PCR product
K1	ACAGTT <u>GGTACC</u> GAAAGCCACGTTGTGTCT	Homologous to 927bp region of 1.3kb <i>Sal</i> I fragment of transposon
K2	ACAGTT <u>TCTAGA</u> TTAGAAAACTCATCGAG	Tn5 <i>gusA5</i> containing the Km resistant gene <i>kan</i>
L7	ACA GTT <u>GAA TTC</u> CGA TCG AAG AGG TGT CCG	Homologous to 789bp region of 8004 strain genome, locating in the
L8	ACA GTT <u>GGT ACC</u> TTG AAC GCG ATA ATG CAG	upstream of <i>waxE</i> gene.
R7	ACA GTT <u>TCT AGA</u> CCG CGG ACT GAG CCA ATG	Homologous to 993bp region of 8004 strain genome, locating in the
R8	ACA GTT <u>GTC GAC</u> TAC GCG ATG TGG AAA ACC	downstream of <i>waxE</i> gene.
F7	ACA GTT <u>GGA TCC</u> TGG GAT GCA AGG TGA GCA	Homologous to 1511bp region of 8004 strain genome, containing the
F8	ACA GTT <u>AAG CTT</u> CCA GCT TTT ATG CCG CGA	complete <i>waxE</i> gene.

* Underlined are endonuclease restriction sites.

2 结果与分析

2.1 EPS 缺陷突变体的获得

采用转座子 Tn5 *gusA5* 对 *Xcc* 进行诱变。通过三亲本接合将质粒 pLAFR1::Tn5 *gusA5* 导入 *Xcc* 野生型菌株 8004 细胞内,得到接合子 8004/pLAFR1::Tn5 *gusA5* 质粒 pLAFR1::Tn5 *gusA5* 的 Tn5 *gusA5* 在 8004 细胞内可通过复制重组随机插入细胞染色体,然后通过二亲本接合将一个与质粒 pLAFR1 及其衍生质粒不相容的质粒 pPH1JI 导入接合子 8004/pLAFR1::Tn5 *gusA5* 细胞内,pPH1JI 和 pLAFR1::Tn5 *gusA5* 在细胞分裂过程不均等地分配到子代细胞,经多代繁殖后,每个子代细胞只有两种质粒中的一种。根据 pPH1JI、Tn5 *gusA5* 和 8004 的抗性标记,在含 Gm、Spc、Km、Rif 的 NYGA 平板筛选菌落形态变小变干燥的菌落,为避免选择到同一插入位点的突变体,在每次诱变时只选择一株突变体,共获得一批 EPS 合成减少(EPS⁻)的突变体。

2.2 Tn5 *gusA5* 插入失活基因的定位

根据 Tn5 *gusA5* 的 IS50R 右末端的序列,设计 3 个在不同位置的向外的特异性嵌套引物,以这三个引物和随机简并引物进行 TAIL-PCR 反应,从突变体中扩增与 Tn5 *gusA5* 相邻的染色体旁侧片段,并对旁侧片段测序。将测序得到的序列通过 blaxtn 软件与 *Xcc* 8004 全基因组序列作同源比较,确定 Tn5 *gusA5* 在基因组的插入位点,发现一株编号为 151D09 的突

变体的 Tn5 *gusA5* 插在基因组 4479282bp 的位置。基因组 4478998bp ~ 4479819bp 的 DNA 序列组成一个编号为 XC3695 的 ORF,因此,EPS⁻突变体 151D09 的插入失活基因是 ORF3695。

2.3 *waxE* 基因的特征

ORF3695 位于 *Xcc* 野生型菌株 8004 基因组 4478998bp ~ 4479819bp 的区域,全长 822bp,编码一个 274 个氨基酸残基组成的蛋白质,蛋白质的预测分子量为 31.0kD,等电点为 9.67。同源比较发现,ORF3695 演绎的编码产物与 GenBank 的 Database 中的粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*) *kdtX* 基因和肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*) *waaE* 基因演绎的编码产物分别具有 52% 和 50% 的相似性,ORF3695 与 *kdtX* 基因和 *waaE* 基因所演绎的氨基酸序列的同源比较见图 1。*kdtX* 基因和 *waaE* 基因编码产物可能是一个糖基转移酶^[25,26]。对 ORF3695 演绎的编码产物进行功能域分析,发现该蛋白质具有第 2 家族糖基转移酶的功能域,该功能域位于蛋白质的第 14 ~ 177 个氨基酸残基之间。因此,该 ORF 可能编码一个糖基转移酶,本工作暂将包含该 ORF 的基因命名为 *waxE* 基因。

2.4 *waxE* 基因的缺失和互补

采用基因置换策略,以 *kan* 基因置换 *waxE* 基因,构建 *waxE* 基因的缺失突变体。将重组质粒 pLAT8976 通过三亲本接合导入 8004 的细胞,由于 pLAT8976 的 *kan* 基因上下游序列与染色体 *waxE* 基

因上下游序列同源,通过同源双交换,染色体 *waxE* 基因可被重组质粒 pLAT8976 的 *kan* 基因替换。利用二亲本接合,将一个与 pLAFR3 不相容的质粒 pPH1JI 导入,筛选发生同源双交换后所产生的 *waxE* 基因缺失突变体,得到 20 株缺失突变体。将 *waxE* 基因的缺失突变体命名为 Xcc 8976。

	1	50
<i>X. campestris</i>	(1) MSSSTAPDEKPRISACIFAFNEADLRDCLTSLAFCDLIVVDSGSDTAT	
<i>S. marcescens</i>	(1) ----MSSRKSLSVVMIAKNEAGLLPDCRSVAWADEIIVLDSGSDS	
<i>K. pneumoniae</i>	(1) ----MSNR--LSVVMIAKNAADLLPDCGLSVWADEIIVLDSGSTNT	
Consensus	(1) MS R LSVVMIAKNEADLLPCL SVAWADEIIVLDSGSTD T	
	51	100
<i>X. campestris</i>	(51) AATAAHGAKL-HRAFDGYRSQAFVCAQASHDWLCLDADERVSDALR	
<i>S. marcescens</i>	(45) VAAVESLGAKYFHTHDWQEGKQRQLAQSASHDWLMDADERVTPELR	
<i>K. pneumoniae</i>	(43) VELARRLGAQVYHTHDWRGYGIRQRQAQDYATGDWVLMIDDERVTPELR	
Consensus	(51) VAIA ALGAKVFHTHDW GYG QRQ AAQAYASHDWLMDADERVTPELR	
	101	150
<i>X. campestris</i>	(100) ASILAARDAGFNAAAGYRFARLSEYFGRFLRGNAYPDRVLRLEDRRRGG	
<i>S. marcescens</i>	(95) QSIFERVLNAPD-DGAVYSCARRNFLGRFMRHSQWYEDRYNREYANSRYR	
<i>K. pneumoniae</i>	(93) QALILKVLDAPO-RCATYSIARRNYFLGRFMRHSQWYEDRYRLRYERARYR	
Consensus	(101) QSILKVLDA P GAIYS ARR NFLGRFMRHSQWYEDRYRLRYDRARYR	
	151	200
<i>X. campestris</i>	(150) WRGKREIHEAASVDGTVATLRCDLJHHPYRSLMQQLKQRYAQMMAEYD	
<i>S. marcescens</i>	(144) YNDLVHELLNIGDAKVIPLSGDMLHLTCRDFAFAPQRKLRFAEEWATQR	
<i>K. pneumoniae</i>	(142) YNDLVHESLDSGAEVPIPETGDLHLTCRDFAGFQKQLAYAAAWALER	
Consensus	(151) YND LVHE L SLDA VIPLSGDMLHLTCRDF AFQ KQLRYA WA R	
	201	250
<i>X. campestris</i>	(200) YARGKRATWSKLYLAPAWRFWRGYYLLRGGFRDGVIGLIVAYYRANVVRGK	
<i>S. marcescens</i>	(194) HRAGKRCGYLSLHTHTLGAEVKTLWLRAGFLDGKQGLLAVYNAQYTFNK	
<i>K. pneumoniae</i>	(192) HQKGGKTSMAGLPSHTLGAFILKTLLEKGGVLDGKQGLLAMVNAQYTFNK	
Consensus	(201) H KGRK SWA ILSHTLGAFKTLWLRGGFLDGKQGLLAMVNAQYTFNK	
	251	275
<i>X. campestris</i>	(250) TIMLWALQQCPVQDPPRAPDQRAD	
<i>S. marcescens</i>	(244) YAAWALGRNYSEK-----	
<i>K. pneumoniae</i>	(242) YTELWALSHGYSEKSS-----	
Consensus	(251) Y LWAL GYSEK	

图 1 *X. campestris waxE* 基因与 *kdtX* 基因、*waaE* 基因所演绎的氨基酸序列的同源性比较

Fig.1 Alignment of deduced amino acid sequences of *waxE*, *kdtX* and *waaE* genes

随机取 4 株 8976(编号为 1~4 号菌株),提取总 DNA,以 8004 菌株的总 DNA 为对照、以 F7、F8 为引物进行 PCR 反应,来验证 *waxE* 基因的缺失。由于 *waxE* 基因全长 822bp 的 752bp 区域被一段 939bp 的带 *kan* 基因的片段所替换,故 PCR 产物应有 187bp 大小的差别。由图 2 可见,以 8004 为模板扩增到的产物大小约 1.5kb,而以突变体为模板扩增到的 PCR 产物大小为 1.7kb,这表明这些突变体的 *waxE* 基因的相应片段已被 *kan* 基因所替换。

通过 Southern 杂交对突变体进行进一步证实。以 PCR 扩增得到的 *waxE* 基因和 *kan* 基因片段为探针,对经 *Pst* I 酶切的野生型菌株 8004 和 *waxE* 基因缺失突变体 8976 的 1~4 号菌株总 DNA 进行 Southern 杂交。由图 3 可见,8004 的杂交带位于约 1.9kb 的位置,而 4 株突变体 8976 的杂交带却位于约

2.1kb 的位置,表明位于 1.9kb *Pst* I 片段的 *waxE* 基因被 *kan* 基因替换后,*Pst* I 片段增大为 2.1kb,与理论计算完全符合。在以下工作中选择 8976 的 1 号菌株进行试验。

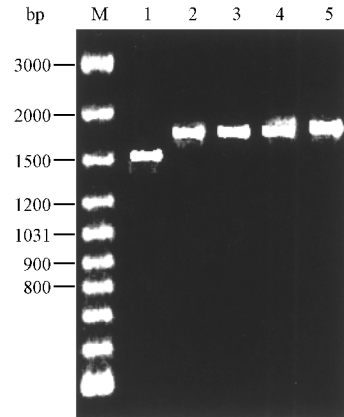


图 2 缺失突变体的 PCR 验证

Fig.2 PCR identification of the deletion mutants.

PCR reactions were performed with total DNA of wild-type strain 8004 and 4 isolates of the deletion mutant 8976 as template respectively, F7 and F8 as primers, and 30 cycles of denaturation at 95°C for 60 s, annealing at 60°C for 30 s, extension at 73°C for 3 min. PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. M, 100bp DNA ladder; 1, 8004; 2~5, four independent isolates of *waxE* gene deletion mutant 8976

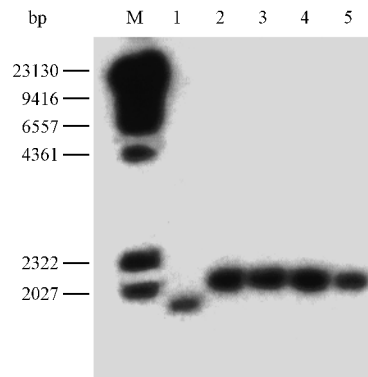


图 3 缺失突变体的 Southern blot 分析

Fig.3 Southern blot analysis of the deletion mutants.

Total DNA of wild-type strain 8004 and 4 isolates of the deletion mutant 8976 were digested with *Pst* I and electrophoresed in 1.0% agarose gel. DNAs were transferred to Nylon membrane, and hybridized with ³²P-labeled *kan* gene and *waxE* gene probes. M, λDNA/*Hind*III Marker; 1, 8004; 2~5, four independent isolates of *waxE* gene deletion mutant 8976

waxE 基因缺失突变体的互补是将携带有完整的 *waxE* 基因的重组质粒导入突变体来实现。所用的重组质粒 pLATC8976 是以质粒 pLAFR3 为载体,克隆入一段约 1.5 kb 的带完整 *waxE* 基因的 DNA 片段(酶切鉴定见图 4),将 pLATC8976 通过三亲本

接合导入突变体 8976 细胞内,得到 15 株接合子 8976/pLATC8976,这 15 株接合子在 NYGA 培养基平板上形成的菌落大小形态与野生型菌株 8004 基本一致,均较大较粘稠,经提质粒证实,这 15 株接合子均携带有重组质粒 pLATC8976。作为对照,将 pLAFR3 导入 8004 和 8976,得到接合子 8004/pLAFR3 和 8976/pLAFR3。

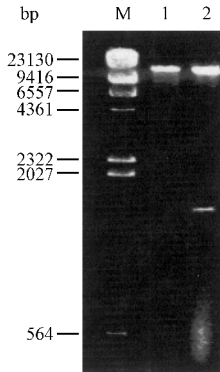


图 4 重组质粒 pLATC8976 的酶切鉴定

Fig.4 Restriction analysis of recombinant plasmid pLATC8976.

Plasmid DNAs were digested with *Bam*H I and *Hind*III, and the reaction mixture were electrophoresed in 1.0% agarose gel. The released 1.5kb fragment from pLATC8976 contained the complete sequence of the gene *waxE*.

M. λ DNA/*Hind*III Marker; 1. pLAFR3 2. pLATC8976

2.5 突变体的生长特征

突变体 8976 在 NYGA 平板形成的菌落较 8004 小而干燥,但在 NYGB 培养基的生长繁殖特征却与 8004 基本相同(见图 5)。表明 *waxE* 基因功能的丧失并没有影响细胞在 NYGB 培养基的生长繁殖。

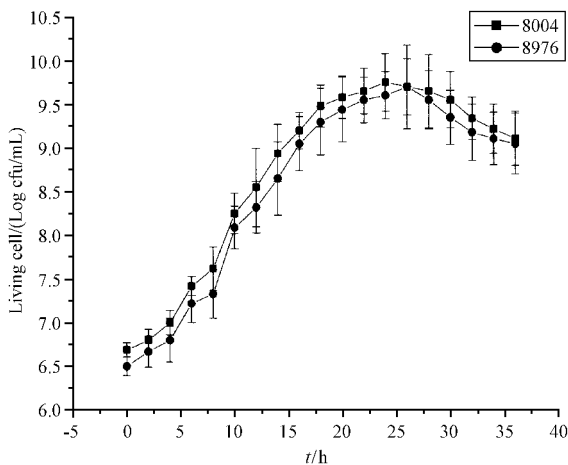


图 5 突变体 8976 与野生型菌株 8004 在 NYGB 培养基中生长曲线的比较

Fig.5 The comparison of growth curve of mutant 8976 and wild-type strain 8004 in rich medium

2.6 EPS 的变化

waxE 基因与 *S. marcescens* 的 *kdtX* 基因和 *K. pneumoniae* 的 *waaE* 基因具有一定的同源性,已知这两个基因可能编码一个糖基转移酶,与 LPS 核心区糖链合成有关^[25,26]。为了解 *waxE* 基因是否参与 LPS 的合成,提取 *waxE* 基因缺失突变体 8976 的 LPS,并以 12% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分析。结果发现突变体 8976 的 LPS 电泳图谱与 8004 相比,没有明显的差异(见图 6)。



图 6 LPS 电泳分析图

Fig.6 SDS-PAGE gel electrophoresis of LPS.

A. LPS from mutant strain 8976 B. LPS from wild-type strain 8004

将 8976/pLAFR3、8976/pLATC8976、8004/pLAFR3 三种菌株分别接种在含 2% 葡萄糖的 NYGA 培养基平板上,28℃ 生长 5 d 后,8976/pLAFR3 形成的菌落与 8004/pLAFR3 相比,菌落较小,而 8976/pLATC8976 形成的菌落大小形态与 8004/pLAFR3 基本一样。这表明 *waxE* 基因缺失突变体的 EPS 合成减少,并且突体能被 *waxE* 基因反式互补,恢复 EPS 的产量。

将 8976、8976/pLAFR3、8976/pLATC8976、8004/pLAFR3 四株菌株的过夜培养物以 1% 的接种量分别接种至加 2% 葡萄糖的 NYGB 培养基,28℃ 摇床培养,分别测定培养 3 d 和 5 d 时各菌株的 EPS 产量,结果见表 2。培养 3 d 时,8976、8976/pLAFR3 和 8976/pLATC8976 的 EPS 产量均低于 8004/pLAFR3;到培养 5 d 时,8976 和 8976/pLAFR3 的 EPS 产量仍然基本相当(每 100mL 培养液约含 0.53g EPS),但 8976/pLATC8976 的 EPS 产量则与 8004/pLAFR3 基本相当(每 100mL 培养液约含 0.80g),8976 和 8976/pLAFR3 的 EPS 产量与 8976/pLATC8976 和 8004/pLAFR3 相比,约降低 35%。这表明 *waxE* 基因与 EPS 的合成有关。

表 2 不同菌株的 EPS 产量

Table 2 EPS yield of different strains

Strain	EPS yield(gram/100mL culture fluid)	
	72h	120h
8976	0.512 ± 0.081	0.534 ± 0.051
8976/pLAFR3	0.505 ± 0.052	0.523 ± 0.042
8976/pLATC8976	0.565 ± 0.082	0.805 ± 0.095
8004/pLAFR3	0.697 ± 0.077	0.825 ± 0.055

* ± standard error

3 讨 论

本研究利用转座子 *Tn5* *gusA5* 对 *Xcc* 8004 直接进行诱变,获得一批 EPS⁻ 的突变体。利用 TAIL-PCR 对突变体的插入失活基因进行定位,克隆到突变体 151D09 的失活基因 *waxE*。对 *waxE* 基因进行缺失和功能互补分析,证实 *waxE* 基因与 *Xcc* 的 EPS 合成有关。

Xcc 的 ATCC33913 菌株的基因组也具有 *waxE* 基因^[18],对该基因的推断认为该基因可能与 LPS 的核心区糖链合成有关,但尚未有实验报道。目前在 *Xcc* 中已克隆和鉴定了一批与 LPS 合成有关的基因,这些基因均位于一个 35.3kb 基因簇内,其中的一些基因也同时参与细胞 LPS 和 EPS 的合成^[27]。本文报道的 *waxE* 基因位于 *Xcc* 8004 菌株基因组 4478998bp ~ 4479819bp 区域内,在上述基因簇以外,其基因产物可能是一个第 2 家族的糖基转移酶。对 *waxE* 基因的功能研究发现该基因与 *Xcc* 的 EPS 合成有关,但在采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对 *waxE* 基因的缺失突变体 8976 的 LPS 进行分析时,却未发现突变体的 LPS 电泳图谱与野生型菌株 8004 有明显差异,但该基因是否影响 LPS 产量或者 LPS 个别糖基的合成等问题还有待深入研究。

Xcc 的 EPS 是由多个“五糖单元”聚合而成。两个 D-葡萄糖分子通过 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键连接成主链骨架,一条由甘露糖($\beta \rightarrow 1,4$)-葡萄糖醛酸($\beta \rightarrow 1,2$)-甘露糖组成的侧链通过 $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 糖苷键连接到主链的一个 D-葡萄糖残基,组成一个“五糖单元”。有的侧链第一个 D-甘露糖分子携带有乙酸,末端的 D-甘露糖分子携带有丙酮酸^[28-30]。这些“五糖单元”的形成需要多种糖核苷衍生物前体。在糖核苷衍生物前体分子和“五糖单元”的形成以及“五糖单元”的聚合过程中,需要多种糖基转移酶分别催化形成不同的糖苷键。本文虽然已明确了 *waxE* 基因与 EPS 合成有关,但对于该基因是否具有推断的糖基转移酶活性以及该糖基转移酶究竟催化哪一类型糖苷键的形成以及在 EPS 合成过程的哪一步骤起作

用等问题仍需深入研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Daniels M J, Collinge D B, Dow M J *et al.* Molecular biology of the interaction of *Xanthomonas campestris* with plants. *Plant Physiol Biochem*, 1987, **25**: 353 - 359
- [2] Kennedy J F, Bradshaw I J. Production, properties and application of xanthan. *Prog Ind Microbiol*, 1984, **19**: 319 - 371
- [3] Baird J, Sandford P, Cottrell I. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. *Bio/Technology*, 1983, **1**: 778 - 783
- [4] Ielpi L, Couso R, Dankert M. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *FEBS Lett*, 1981, **130**: 253 - 256
- [5] Ielpi L, Couso R O, Dankert M A. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. *Biochem Int*, 1983, **6**: 323 - 333
- [6] Ielpi 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**: 2490 - 2500
- [7] Harding N E, Cleary J M, Ielpi L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*, 1995, pp. 495 - 514. In Y. H. Hui, and G. Khachatourians (ed.), Food biotechnology microorganism. VCH Publishers, Inc. New York, N. Y.
- [8] Harding N E, Raffo S, Raimondi A *et al.* Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis sugar nucleotide precursors of xanthan gum. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 447 - 457
- [9] Köpflin R, Arnold W, Hötte B *et al.* Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 191 - 199
- [10] Capage M R, Doherty D H, Belach M R *et al.* Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum, March 1987, International patent W087/05938
- [11] Harding N E, Cleary J M, Cabañas D K *et al.* Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 2854 - 2861
- [12] Vanderslice R W, Doherty D H, Capage M A *et al.* Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*, 1988, pp. 145 - 157. In V. Crescenzi, I. C. M. Dea, S. Paoletti, S. S. Stivala, I. W. Sutherland (ed.). Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides. Gordon and Breach Science Publishers, New York, N. Y.
- [13] de Crecy-Lagard V, Glaser P, Lejeune P *et al.* A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* protein similar to catabolite activation factor is involved in regulation of phytopathogenicity. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 5877 - 5883
- [14] Tang J L, Gough C L, Daniels M J. Cloning of genes involved in negative regulation of production of extracellular enzymes and polysaccharide of *Xanthomonas campestris pathovar campestris*. *Mol Gen Genet*, 1990, **222**: 157 - 160
- [15] 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**: 409 - 417
- [16] Barber C E, Tang J L, Feng J X *et al.* A novel regulatory system

- small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* ,1997 **24** 555 – 566
- [17] Poplawsky A R , Chun W. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Mol Plant Microbe Interact* , 1998 **11** 466 – 475
- [18] 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** 459 – 463
- [19] Turner P , Barber C , Danniel M. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Gen Genet* , 1984 **195** :101 – 107
- [20] Liu Y G , Mitsukawa N , Oosumi T *et al.* Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* , 1995 **8** 457 – 463
- [21] Birnboim H C , Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* , 1979 **7** : 1513 – 1523
- [22] Chen W P , Kuo T T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* , 1993 **21** : 2260
- [23] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [24] Hitchcock P J , Brown T M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* , 1983 **154** 269 – 277
- [25] Guasch J F , Pique N , Regue M *et al.* Cloning and characterization of two *Serratia marcescens* genes involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* , 1996 **178** 5741 – 5747
- [26] Regue M , Climent N , Tomas J M *et al.* Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster , involved in core lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* , 2001 **183** 3564 – 3573
- [27] Vorholter F J , Niehaus K , Pühler A *et al.* 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
- [28] Jansson P E , Kenne L , Lindberg B. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* , 1975 , **45** 275 – 282
- [29] Cadmus M C , Rogovin S P , Burton K A *et al.* Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can J Microbiol* , 1976 **22** 942 – 948
- [30] Stankowski J , Mueller B , Zeller S. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. *Carbohydr Res* , 1993 **241** 321 – 326

Identification and Cloning of a Novel Gene Involved in EPS Biosynthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

LU Guang-Tao^{1 2} TANG Ji-Liang^{2*} HE Yong-Qiang² CHEN Bao-Shan² TANG Dong-Jie²

¹(College of Agriculture and Biotechnology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

²(Institute of Molecular genetics , Guangxi University , Nanning 530005 , China)

Abstract *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), causative agent of the black rot disease of cruciferous crops worldwide , produces large amount of extracellular polysaccharide(EPS), which has found wide applications in industry. In order to clone genes involved in EPS biosynthesis , *Xcc* wild-type strain 8004 was mutagenized with transposon Tn5 *gusA5* , and a number of EPS-defective mutants were isolated. The Tn5 *gusA5* insertion sites in the mutants were analyzed by using thermal asymmetric interlaced PCR(TAIL-PCR), and the corresponding genes were identified by homology blast to the completely sequenced genome of *Xcc* 8004 strain. A novel gene , *waxE* , identified from the EPS-defective mutant 151D09 , was found to be disrupted by the insertion of Tn5 *gusA5* in the open reading frame(ORF) with genome coordinates 4478998bp to 4479819bp. This gene showed 52% similarity to the *kdtX* gene of *Serratia marcescens* and 50% to the *waaE* of *Klebsiella pneumoniae* at amino acid level , with characteristics of glycotransferase 2 family domain. In order to identify the function of *waxE* gene , *waxE* gene deletion mutant of *Xcc* 8004 was constructed by gene replacement strategy in which *waxE* gene of genome was replaced by kanamycin resistant gene *kan* . The *waxE* gene deletion mutant strain , named *Xcc* 8570 , was confirmed by both PCR and southern analysis. The growth rate of the deletion mutant 8570 in rich medium was not affected , but the EPS yield reduced by 35% as compared with the wild-type strain 8004. The deletion mutant could be complemented *in trans* with plasmid pLATC8976 harboring an intact *waxE* gene , and the EPS yield of the mutant was restored. The combined data showed that *waxE* gene involved in EPS biosynthesis in *Xcc* .

Key words *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* , extracellular polysaccharide , *waxE* gene

Received : 04-10-2003

This work was supported by a key grant from National Natural Science Foundation of China(No.30130010).

* Corresponding author. Tel : 86-771-3233650 Fax 86-771-3237873.