

文章编号: 1674-7054(2015)02-0119-08

野油菜黄单胞菌的 *HpaA* 基因功能

邹俊 戎伟 李慧萍 林道哲 何朝族

(海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海口 570228)

**摘要:** 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, *Xcc*) 是使十字花科植物产生黑腐病的重要病原细菌。*Xcc* 通过Ⅲ型分泌系统分泌效应蛋白到植物体内帮助 *Xcc* 的侵染和繁殖。*HpaA* 蛋白是一个广泛存在于黄单胞菌中的效应蛋白,在辣椒斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) 中, *HpaA*<sub>*Xcc85-10*</sub> 已经被证明是一个Ⅲ型效应蛋白,并且参与其他效应蛋白的分泌过程,但是在 *Xcc* 中,对 *HpaA* 的功能还不是了解得很清楚。本研究以 *Xcc8004* 菌株的 *HpaA* 蛋白为研究对象,通过分泌蛋白检测和亚细胞定位分别研究 *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 是否也由Ⅲ型分泌系统分泌以及 *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 在植物细胞的作用部位。结果表明, *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 的分泌依赖于 *Xcc8004* 的Ⅲ型结构基因 *hrcV*,暗示着 *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 也是作为Ⅲ型分泌效应蛋白来发挥功能。在拟南芥原生质体细胞中,将 *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 与 GFP 蛋白融合表达,发现 *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 定位于植物细胞核中。进一步通过同源重组的方法获得了 *Xcc8004* *HpaA* 基因缺失突变体,在寄主甘蓝、萝卜、拟南芥上分别接种野生型 *Xcc8004* 和 *HpaA* 基因缺失突变体,发现基因缺失突变体毒性显著降低,表明 *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 在上述寄主植物上对于 *Xcc8004* 的完整毒性是必须的。在 *HpaA* 的拟南芥转基因植株上, *HpaA*<sub>*Xcc8004*</sub> 还可以减弱假单胞菌 DC3000 和 *Xcc8004* 发黄的表型。

关键词: *Xcc8004*; Ⅲ型分泌系统; *HpaA* 基因

中图分类号: Q 344+.14

文献标志码: A

植物病原细菌能引发许多常见的植物病害,其中黄单胞菌属病原细菌引起的病害遍及全世界,能侵染 124 种单子叶植物和 268 种双子叶植物<sup>[1-2]</sup>,给农业生产造成重大损失。在病原菌与寄主相互作用的过程中,病原菌通过自身的分泌系统将各种蛋白质分泌到寄主体内,从而达到在寄主体内侵染和繁殖的目的。目前认为,细菌的分泌系统有 7 种类型,其中,病原菌的Ⅲ型分泌系统对病原菌与寄主的相互作用起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。在黄单胞菌属Ⅲ型分泌系统中了解比较清楚的是辣椒斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*)。*Xcv* 的Ⅲ型分泌系统是由 *hrp*(hypersensitive reaction and pathogenicity) 基因编码的,大约由 20 个不同的蛋白质组成<sup>[4]</sup>,其中,约有 11 个基因编码的蛋白质不论是在动物还是在植物病原细菌中都非常保守<sup>[5]</sup>,因此,这些基因被命名为 *hrc*(*hrp* conserved) 基因,暗示着不同的细菌中Ⅲ型分泌装置的核心结构是相似的。病原菌成功地将效应蛋白分泌到宿主细胞内,还需要Ⅲ型分泌易位子(translocon)的参与,它是一个异源的寡聚蛋白通道<sup>[6]</sup>。在 *Xcv* 病菌中,Ⅲ型分泌蛋白的分泌主要通过 *hpa*(*hrp*-associated) 基因编码的产物来调控<sup>[7]</sup>。例如, *HpaC* 可以调控效应蛋白 *AvrBs3*, *XopC*, *XopJ*, *XopF1* 以及易位子蛋白 *XopA* 和 *HrpF* 的分泌,然而, *HpaC* 并不能被Ⅲ型分泌系统分泌到植物细胞内<sup>[8]</sup>。*HpaC* 可以在病原菌的内膜上,与一个效应蛋白的分子伴侣蛋白 *HpaB* 发生相互作用,形成异源二聚体,引导易位子蛋白和效应蛋白通过Ⅲ型分泌系统<sup>[8]</sup>。*HpaB* 主要调控效应蛋白 *AvrBs1*, *AvrBs3*, *AvrBsT*, *XopC*, *XopJ* 和 *XopF1* 的分泌<sup>[9]</sup>, *HpaB* 和 *HpaC* 对于 *Xcv* 在寄主植物上的完整毒性都是必须的。据文献[10]报道, *HpaA* 蛋白作为 *Xcv* 的毒性因子,定位于植物细胞核中,并且可以被Ⅲ型分泌系统分泌到植物细胞内。*HpaA* 与 *HpaB* 可以发生相互作用,从而调控Ⅲ型分泌系统 Pilus 蛋白、易位子蛋白以及效应蛋白的分泌。野油菜

收稿日期: 2015-01-30

基金项目: 海南大学青年基金资助项目(qnj1204), 海南省自然科学基金资助项目(314043)

作者简介: 邹俊(1991-),男,海南大学农学院 2012 级硕士研究生, E-mail: 252862307@qq.com

通信作者: 戎伟(1978-),男,海南大学农学院,讲师,研究方向: 植物与病原微生物相互作用, E-mail: rongwei13@126.com

黄单胞菌小种 *Xcc8004* 基因组测序已完成<sup>[11]</sup>, 通过序列比对, 笔者发现 *Xcc8004* 中的 HpaA 与 *Xcc85-10* 中的 *HpaA* 同源率为 57%, 表明 HpaA<sub>*Xcc8004*</sub> 可能也是作为一个Ⅲ型分泌蛋白来发挥功能的。本研究以 *Xcc8004* 菌株的 HpaA 蛋白为研究对象, 通过分泌蛋白检测和亚细胞定位分别探究 HpaA<sub>*Xcc8004*</sub> 是否也由Ⅲ型分泌系统分泌以及 HpaA<sub>*Xcc8004*</sub> 在植物细胞的作用部位。利用致病性试验检测 HpaA<sub>*Xcc8004*</sub> 对于 *Xcc8004* 在甘蓝、萝卜、拟南芥上的毒性变化。通过构建 HpaA 的拟南芥转基因植株, 以探究 HpaA<sub>*Xcc8004*</sub> 在植物体内的功能。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 本实验菌株和质粒见表 1, 引物见表 2。甘蓝品种(京丰 1 号、中甘 21 号)购自中国农科院蔬菜花卉研究所, 萝卜品种(板叶红袍)、白菜品种(常丰四九菜心)购自北京绿金蓝种苗有限责任公司, 拟南芥野生型 Col-0 来自本实验室。PCR 酶切连接试剂购自 Thermo Scientific 公司, His 单克隆抗体、FLAG 单克隆抗体、GroEL 单克隆抗体、抗鼠和抗兔的二抗购自 Sigma 公司。

表 1 实验用菌株和质粒  
Tab. 1 Strains and plasmids used in the study

| 菌株和质粒<br>Strain and plasmid          | 相关特征<br>Relevant characteristics                                                                                               | 来源<br>Source      |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <i>Xcc8004</i>                       | 野生型黄单胞菌<br>Wide-type, Rif <sup>r</sup>                                                                                         | 本实验室<br>This lab  |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ | 克隆用菌株<br><i>F-recA hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) <math>\Phi_{80}</math> dLacZ DM15</i>           | 全式金<br>TransGen   |
| GV3101                               | 农杆菌<br><i>Agrobacterium</i> , Rif <sup>r</sup>                                                                                 | 本实验室<br>This lab  |
| $\Delta hpaA$                        | <i>hpaA</i> 缺失突变体<br><i>hpaA</i> knockout mutant of <i>Xcc8004</i> , Rif <sup>r</sup>                                          | 本研究<br>This study |
| $\Delta hrcV$                        | <i>hrcV</i> 缺失突变体<br><i>hrcV</i> knockout mutant of <i>Xcc8004</i> , Rif <sup>r</sup>                                          | 本实验室<br>This lab  |
| pK18Mob SecB                         | 自杀质粒<br>Suicide plasmid in <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , Km <sup>r</sup>                                        | 本实验室<br>This lab  |
| pHM1                                 | 广泛性寄主的互补质粒<br>Broad-host-range cos parA IncW derivative of pRI40, Sp <sup>r</sup>                                              | 本实验室<br>This lab  |
| pRK2013                              | 三亲接合辅助质粒<br>ColE1 replicon, TraRK <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup>                                              | 本实验室<br>This lab  |
| pER8-Flag                            | 转基因用质粒, 具有雌激素诱导型启动子<br>Genetically modified vector under the control of the oestrogen-inducible promoter, Sp <sup>r</sup>      | 本实验室<br>This lab  |
| pUC19                                | 原生质体瞬时表达用载体<br>ColE1 replicon, Ap <sup>r</sup>                                                                                 | 本实验室<br>This lab  |
| <i>hpaA</i> -gfp-pUC19               | 携有 <i>hpaA</i> 和 <i>gfp</i> 的 pUC19<br>pUC19 containing <i>hpaA</i> and <i>gfp</i> gene                                        | 本研究<br>This study |
| <i>gfp</i> -pUC19                    | 携有 <i>gfp</i> 的 pUC19<br>pUC19 containing <i>gfp</i> gene                                                                      | 本研究<br>This study |
| <i>hpaA</i> -pHM1                    | 携有 <i>hpaA</i> 的 pHM1<br>pHM1 containing <i>hpaA</i> gene                                                                      | 本研究<br>This study |
| $\Delta hpaA$ + <i>hpaA</i> -pHM1    | 携有 <i>hpaA</i> -pHM1 质粒的 <i>hpaA</i> 缺失突变体<br>$\Delta hpaA$ mutant containing <i>hpaA</i> , Rif <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> | 本研究<br>This study |
| $\Delta hpaA$ + pHM1                 | 携有 pHM1 质粒的 <i>hpaA</i> 缺失突变体<br>$\Delta hpaA$ mutant containing pHM1, Rif <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>                      | 本研究<br>This study |
| <i>hpaA</i> -pER8                    | 携有 <i>hpaA</i> 的农杆菌 GV3101<br>GV3101 containing <i>hpaA</i> , Rif <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>                               | 本研究<br>This study |
| pER8                                 | 携有 pER8-Flag 空载体的农杆菌 GV3101<br>GV3101 containing pER8-Flag, Rif <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>                                 | 本研究<br>This study |
| A-8004                               | 携有 <i>hpaA</i> -pHM1 的野生型 <i>Xcc8004</i><br><i>Xcc8004</i> containing <i>hpaA</i> -pHM1, Rif <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>    | 本研究<br>This study |
| A- $\Delta hrcV$                     | 携有 <i>hpaA</i> -pHM1 的 <i>hrcV</i> 缺失突变体<br>$\Delta hrcV$ containing <i>hpaA</i> -pHM1, Rif <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup>     | 本研究<br>This study |

注: Rif = 利福平, Km = 卡那霉素, Ap = 氨苄青霉素, Sp = 壮观霉素

Note: Rif = Rifampicin; Km = Kanamycin; Ap = Ampicillin; Sp = Spectinomycin

表 2 实验用引物  
Tab. 2 Primer sequence used in the study

| 引物<br>Primer | 引物序列<br>Sequence of primers    | 用途<br>Function                                   |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------------------------|
| hpaA-FF      | CGGAATTCGTTGTTCTGTCGCGCTGGATGG | <i>hpaA</i> 基因敲除<br><i>hpaA</i> gene knockout    |
| hpaA+FR      | CGGGATCCGCACAGCGCCTGGCGAAATG   | <i>hpaA</i> 基因敲除<br><i>hpaA</i> gene knockout    |
| hpaA-RF      | CGGGATCCGTAAACGCCTCGATCGCGC    | <i>hpaA</i> 基因敲除<br><i>hpaA</i> gene knockout    |
| hpaA-RR      | CCCAAGCTTTAGCATGGCGCCCACCACTG  | <i>hpaA</i> 基因敲除<br><i>hpaA</i> gene knockout    |
| hpaA-F       | CCGCTCGAGATGATCCGGCGCATTTTCG   | <i>hpaA</i> 基因扩增<br>Amplification of <i>hpaA</i> |
| hpaA-R       | CCGTTCGAATGCGCGAATCTCCTGAGC    | <i>hpaA</i> 基因扩增<br>Amplification of <i>hpaA</i> |
| GFP-F        | CCGTTCGAAATGGTGAGCAAGGGCGAGG   | <i>gfp</i> 基因扩增<br>Amplification of <i>gfp</i>   |
| GFP-R        | GGACTAGTTTATCTAGATCCGGTGGATCC  | <i>gfp</i> 基因扩增<br>Amplification of <i>gfp</i>   |

1.2 三亲本接合法<sup>[12]</sup> 敲除 *Xcc8004* 菌株的 *HpaA* 基因 以 *Xcc8004* 基因组 DNA 为模板, 扩增 *HpaA* 基因两翼各约 400 bp 的序列, 通过 *EcoR* I, *Bam*H I, *Hind* III 酶切位点将 2 个片段一起构建到自杀质粒 *pK18mobSacB* 中, 命名为 *pK18-HpaA*。活化细菌 *Xcc8004* *pRK2013* *pK18-HpaA* 等体积离心收集 3 种菌, 用  $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  洗涤 2 次后, 将 3 种菌混合并加入  $150\text{ }\mu\text{L}$  NYG 液体培养基(蛋白胨  $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酵母提取物  $3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甘油  $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 悬起菌体转移至平铺于 NYG 平板上的  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜上,  $28\text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h。将滤膜上的菌体涂布于含卡那霉素和利福平的 NYG 平板上, 挑取阳性单克隆,  $28\text{ }^\circ\text{C}$  培养 3 d。以含 15% 蔗糖的 NYG 平板进行筛选, 最后用 PCR 鉴定, 所获突变体命名为  $\Delta HpaA$ 。

1.3  $\Delta HpaA$  突变体互补菌株的构建 扩增出的 *HpaA* 全长基因, 通过 *Kpn*I、*Eco*RI 酶切位点连接到 *pHM1* 载体上, 获得质粒 *HpaA-pHM1*, 将 *HpaA-pHM1*, *pHM1* 分别转化大肠杆菌 *DH5 $\alpha$*  中, 再通过三亲本接合法导入  $\Delta HpaA$  突变体中, 命名为  $\Delta HpaA + HpaA-pHM1$ ; 导入 *pHM1* 空载体到  $\Delta HpaA$  突变体中, 用作对照, 命名为  $\Delta HpaA + pHM1$ 。

1.4 甘蓝、萝卜、白菜、拟南芥和烟草接种 过夜培养细菌, 调整菌体浓度为  $OD_{600} = 0.1$ , 取 5~6 周大的甘蓝、萝卜、白菜平整叶片, 用剪刀蘸取菌液, 剪去叶尖 1~2 cm 处, 加盖保湿 1 d, 6~8 d 观察症状并拍照; 调整菌体浓度为  $OD_{600} = 0.01$ , 取 4 周大的拟南芥叶片, 用注射器吸取菌液将整片叶注射满, 加盖保湿 1 d, 5~8 d 观察现象。活化农杆菌 *GV3101*, 调整菌体浓度至  $OD_{600} = 0.4$ , 注射烟草叶片 1 d 后, 喷洒雌激素在叶片表面, 过夜诱导表达后, 取 1~2 片烟草叶片, 用液氮磨样, 加入适量蛋白提取缓冲液( $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-KOH pH 7.5,  $0.15\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl,  $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 0.2% Triton-X100,  $0.001\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, cocktail 蛋白酶抑制剂), 冰上放置 5 min 后,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $13\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清 Western Blot 检测。超敏反应可在 3~4 d 后观察并拍照。

1.5 蛋白分泌检测 将 *HpaA-pHM1* 转入 *Xcc8004* 以及  $\Delta hrcV$  突变体中。先用 NYG 培养液将细菌富集培养,  $4\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  10 min 收集细菌, 用  $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  洗涤 2 次, 将细菌转移至诱导培养基 SMMXC ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $10.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $4.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 蔗糖  $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 果糖  $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 谷氨酸钠  $4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Casamino Acid 0.03%, BSA  $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 中诱导培养过夜, 离心收集上清蛋白, 用 TCA 沉淀上清液蛋白; 菌体沉淀用 TBS(Tris  $2.42\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , NaCl  $8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 调至 8.0) 溶解, 超声波振荡裂解(功率 85%, 超声 4 s, 停 6 s) 直至溶液呈现澄清状态, 离心除去裂解杂质, 再以 Western Blot 检测。

1.6 氯化铯梯度离心法<sup>[13]</sup> 大量提取质粒 大量培养细菌, 离心收集菌体。加入 10 mL 溶液 I ( $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Glucose,  $0.025\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, pH 8.0), 振荡重悬, 再加入 20 mL 溶液 II ( $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

NaOH 1% SDS) 混匀至菌体变清后加入 10 mL 溶液Ⅲ(3 mol · L<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONa 2 mol · L<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COOH) 后冰上放置 5 min。23 ℃ 13 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min 将上清移至 50 mL 离心管 加入异丙醇 30 min 后 离心弃上清并以 70% 乙醇洗涤沉淀 晾干后加入 8 mL 超纯水溶解 并加入 11.8 g CsCl 和 320 μL EB 将液体移至超速离心管中 23 ℃ 65 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 h。吸取红色质粒环 用异戊醇萃取 EB 直至红色消失。取下层质粒于 1.5 mL 离心管中 加入 4 倍体积 70% 乙醇沉淀 30 min。离心弃上清 用 70% 乙醇洗 3 次 晾干后加入适量超纯水溶解。

1.7 原生质体转化 将拟南芥叶片切成细丝挑进装有酶解液的三角瓶中 室温下 45 r · min<sup>-1</sup> 直到酶解完全。过滤至离心管中 室温 650 r · min<sup>-1</sup> 离心 3 min 弃上清后用 W5 溶液洗涤 再加入 20 mL W5 溶液后冰上放置 30 min。离心弃上清 加入适量浓度 Mg 溶液并加入质粒混匀 再加入等体积 PEG 溶液放置 7 min。加入 4 倍体积 W5 溶液 离心弃上清 再用 W5 溶液洗涤 4 次 最终加入 1 mL W5 溶液平放于弱光下过夜培养。各溶液的配方参照文献 [14]。

1.8 亚细胞定位 将扩增出的 *HpaA*-gfp 全长序列 通过 XhoI、BstBI、SpeI 酶切位点构建到 35S-pUC19 质粒中 得到 *HpaA*-gfp-pUC19; 将 *gfp* 全长序列 BstBI、SpeI 酶切位点构建到 35S-pUC19 中用作对照。采用氯化铯梯度离心法大量提取质粒 转化拟南芥原生质体 弱光过夜培养 第 2 天用细胞核荧光染料 DAPI 处理样品 2 min 通过激光共聚焦显微镜 LEICA-TCS-SP8 观察其细胞定位(激发光波长 488 nm 发射光波长 500 ~ 530 nm)。

## 2 结果与分析

2.1 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 氨基酸序列与 *HpaA*<sub>Xcv85-10</sub> 表现出 57% 同源性 将 *Xcc8004* 中的 *HpaA* 蛋白氨基酸序列与 *Xcv85-10* 中的 *HpaA* 蛋白氨基酸序列放于 NCBI 网站上的 Protein BLAST( <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ) 进行比对 发现两者具有 57% 的同源性(图 1) 表明在 *Xcc8004* 中的 *HpaA* 蛋白与 *Xcv85-10* 中的 *HpaA* 蛋白同源性并不高 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 是否像 *HpaA*<sub>Xcv85-10</sub> 一样可以由Ⅲ型分泌系统分泌到植物细胞内还有待于进一步研究。*HpaA*<sub>Xcv85-10</sub> 在第 54 ~ 60 第 244 ~ 247 位氨基酸处有 2 个核定位序列 这 2 个序列在 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 也比较保守 分别位于 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 第 50 ~ 56 第 240 ~ 244 位氨基酸处 说明 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 也有可能定位在植物细胞核内发挥功能。

| Range 1: 1 to 274 Graphics |            | ▼ Next Match ▲ Previous Match                                       |              |                |
|----------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|
| Score                      | Expect     | Method                                                              | Identities   | Positives      |
| 229 bits(584)              | 4e-78      | Compositional matrix adjust.                                        | 155/274(57%) | 185/274(67%)   |
|                            |            |                                                                     |              | Gaps 4/274(1%) |
| <b>Q1- Query</b>           | <b>1</b>   | <b>MIRRISPGAVPPSLP----SAPGASHHHADAPQAGVQPPADTAHHAPRLRPAPPRKRRRG</b> |              | <b>56</b>      |
| <b>Q2- Sbjct</b>           | <b>1</b>   | <b>MIRRISPG + PS+ + HHADA P D A APRLRPAPPR+RRRG</b>                 |              | <b>60</b>      |
| <b>Query</b>               | <b>57</b>  | <b>MRLDGMDELDATELEEAARVSALRGRVSIAVAQFQGGQGRQDDQHGEQNAQAGDP</b>      |              | <b>116</b>     |
| <b>Sbjct</b>               | <b>61</b>  | <b>IRSLDGQDEDFDANEQEEIEAKRECALRGRVSVAITPAQSRHGGQDQHGGDRSTHTDDP</b>  |              | <b>120</b>     |
| <b>Query</b>               | <b>117</b> | <b>QAGTWPIAAPSQVDDSSARASVQEVLDRYAATPAADQTIIRRRALAVELRAIGVAHPAA</b>  |              | <b>176</b>     |
| <b>Sbjct</b>               | <b>121</b> | <b>QAGPWHSAAAPQLSDSIRTCIDAIVDRYVTRRDADPVAKRHALAAALVELRAVGVSHPAV</b> |              | <b>180</b>     |
| <b>Query</b>               | <b>177</b> | <b>AQLTTMVWRLMREHLHSGSAGAAAETLQALRKRLDLVPAQPDTSFALRSFHLPLMLL</b>    |              | <b>236</b>     |
| <b>Sbjct</b>               | <b>181</b> | <b>APLTATIWRLMREHLRAYDKATAAENLLALRTRLELMPSELEFPVPAIRNFHLLPLILL</b>  |              | <b>240</b>     |
| <b>Query</b>               | <b>237</b> | <b>NAEKPRKRLDRARAITRLNTILLIEHHDGTAQEIR</b>                          | <b>270</b>   |                |
| <b>Sbjct</b>               | <b>241</b> | <b>NAEKPR+R+DR AITRLNTILLIE AQE+R</b>                               | <b>274</b>   |                |

图 1 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 与 *HpaA*<sub>Xcv85-10</sub> 氨基酸序列同源性比对

Q1: *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 的氨基酸序列; Q2: *HpaA*<sub>Xcv85-10</sub> 的氨基酸序列

Fig. 1 The amino acid sequence alignment of *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> and *HpaA*<sub>Xcv85-10</sub>

Q1: *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> amino acid sequence; Q2: *HpaA*<sub>Xcv85-10</sub> amino acid sequence

2.2 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 蛋白的分泌依赖于 *Xcc8004* Ⅲ型分泌系统分泌 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 与 *HpaA*<sub>Xcc85-10</sub> 表现出 57% 的同源性,表明 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 可能作为 *Xcc8004* 的Ⅲ型分泌效应蛋白被分泌胞外。为了检测这一可能性,笔者将 *HpaA*-pHM1 分别导入野生型 *Xcc8004* 菌中和 *Xcc8004* Ⅲ型分泌系统结构基因突变体  $\Delta hrcV$  中, *hrcV* 的突变会导致 *Xcc8004* 不能分泌效应蛋白进入植物细胞<sup>[15]</sup>。将携有 *HpaA*-pHM1 的 *Xcc8004*  $\Delta hrcV$  富集培养后,取等量 *Xcc8004*  $\Delta hrcV$  的菌体总蛋白及上清液蛋白,利用 Western Blot 检测。结果表明,携有 *HpaA*-pHM1 的 *Xcc8004*、携有 *HpaA*-pHM1 的 *hrcV* 突变体的菌体裂解物中都可以检测到 *HpaA* (图 2)。然而,只有携有 *HpaA*-pHM1 的 *Xcc8004* 的诱导培养上清液中能检测到 *HpaA*,携有 *HpaA*-pHM1 的 *hrcV* 突变体培养上清液中检测不到,说明 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 可以被 *Xcc8004* 分泌到胞外,并且 *hrcV* 的缺失导致 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 不能被分泌到胞外,表明 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 是由Ⅲ型分泌系统分泌的。

2.3 *Xcc8004* *HpaA* 基因缺失突变体的构建 为了进一步研究 *HpaA* 基因的功能,笔者构建了 *HpaA* 基因的缺失突变体  $\Delta HpaA$ 。PCR 扩增 *HpaA* 基因上游 356 bp 片段,下游 466 bp 片段并通过 *EcoR* I, *Bam* H I, *Hind* III 酶切位点一起克隆到 pK18mobsacB 载体上得到 pK18-*HpaA*,利用三亲本接合法将 pK18-*HpaA* 载体导入到 *Xcc8004* 中,经过 2 次同源重组并筛选后,提取目的单克隆菌株基因组,通过敲除引物 *HpaA*-FF, *HpaA*-RR 进行 PCR 验证, Lane 3, 4 可扩增出 822 bp 的条带 (图 3),确认得到 Lane 3, 4 为突变体菌株  $\Delta HpaA$ 。

2.4 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 对于 *Xcc8004* 在甘蓝、萝卜、白菜、拟南芥上的完整毒性是必须的 *HpaA*<sub>Xcc85-10</sub> 在辣椒和西红柿上发挥毒性功能<sup>[10]</sup>,为了检测 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 是否对于 *Xcc8004* 在寄主上的完整毒性是必须的,笔者接种了 *Xcc8004* 的寄主甘蓝、萝卜、白菜。分别将野生型 *Xcc8004* 和  $\Delta HpaA$  突变体利用剪刀剪切的方法接种甘蓝 (京丰 1 号、中甘 21 号)、萝卜 (板叶红袍)、白菜 (常丰四九菜心)。接种 7 d 后,笔者发现野生型 *Xcc8004* 在京丰 1 号、中甘 21 号、板叶红袍和常丰四九菜心上出现典型的 V 字型病斑 (图 4),然而  $\Delta HpaA$  在接种 7 d 后,致病力显著下降,在上述寄主植物上基本不表现发黄的表型 (图 4),说明 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 对于 *Xcc8004* 在甘蓝、萝卜、白菜上的全毒性是必须的。

为了进一步检测 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 的毒性功能,笔者利用注射方法在拟南芥野生型 Col-0 上接种了 *Xcc8004*  $\Delta HpaA$ , 互补了 *HpaA*-pHM1 的  $\Delta HpaA$ , 互补了空载体 pHM1 的  $\Delta HpaA$  菌株。结果显示,接种 6 d 后,野生型 *Xcc8004* 在拟南芥上出现明显发黄的表型 (图 5),而 *HpaA* 的缺失对 *Xcc8004* 在拟南芥上的致病力也会造成下降,发黄的表型变弱 (图 5)。同时,将 *HpaA* 互补回突变体中可以使 *Xcc8004* 的致病力得到恢复,然而将空载体互补进突变体中没有发现变化 (图 5),说明 *HpaA* 的存在与否造成了 *Xcc8004* 致病力的变化。

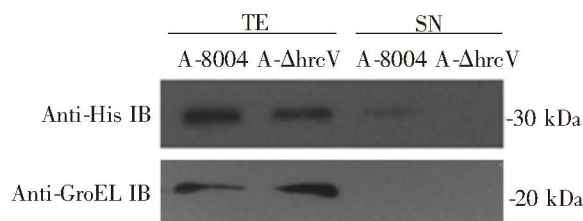


图 2 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> 通过Ⅲ型分泌系统分泌

将携有 *HpaA*-pHM1 的 *Xcc8004* 和携有 *HpaA*-pHM1 的  $\Delta hrcV$  分别在诱导培养基 SMMXC 中培养。菌体总裂解物 (TE) 和培养上清液 (SN) 通过 Anti-His 检测 *HpaA* 蛋白, Anti-GroEL 检测 GroEL 蛋白

Fig. 2 *HpaA*<sub>Xcc8004</sub> can be secreted via the *Xcc8004* type III secretion system

*Xcc8004* carrying *HpaA*-pHM1 and  $\Delta hrcV$  carrying *HpaA*-pHM1 were incubated in secretion medium SMMXC. Total cell extracts (TE) and culture supernatants (SN) were respectively analyzed by immunoblotting assay. Anti-His antibody was used to detect *HpaA*, and Anti-GroEL antibody was used to detect GroEL

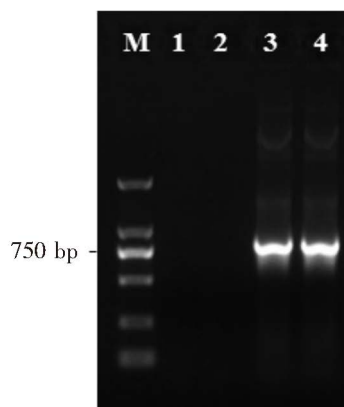


图 3 *HpaA* 缺失突变体的 PCR 验证  
Lane 1: H<sub>2</sub>O; Lane 2: *Xcc8004*; Lane 3: *HpaA* 缺失突变体; Lane 4: *HpaA* 缺失突变体

Fig. 3 PCR verification of *HpaA* deletion mutants  
Lane 1: H<sub>2</sub>O; Lane 2: *Xcc8004*; Lane 3: *HpaA* mutant strains; Lane 4: *HpaA* mutant strains; Lane M: DL 2 000 DNA Marker

2.5  $HpaA_{Xcc8004}$  对于  $Xcc8004$  在烟草上引起的超敏反应是必须的 效应蛋白起初是作为无毒基因被发现的, 在含有相应抗病基因(Resistance gene, R)的寄主植物上 R 基因可以识别无毒基因, 从而激活基因对基因抗性, 即超敏反应(hypersensitive response, HR) [16]。文献报道  $Xcc8004$  在烟草品种本明烟上会产生超敏反应 [17], 为了检测  $HpaA_{Xcc8004}$  的缺失是否会改变  $Xcc8004$  在烟草上激活 HR 反应, 笔者将  $Xcc8004 \Delta HpaA$ 、互补了  $HpaA$ -pHM1 的  $\Delta HpaA$  和互补了空载体 pHM1 的  $\Delta HpaA$  注射于烟草叶片背面。结果表明, 接种 4 d 后, 野生型  $Xcc8004$  在烟草表面可以激活明显的 HR 反应(图 6), 然而,  $HpaA_{Xcc8004}$  的缺失会造成烟草对  $Xcc8004$  超敏反应的丧失(图 6), 而互补了  $HpaA$  的突变体可以恢复 HR(图 6) 结果表明,  $HpaA_{Xcc8004}$  对于  $Xcc8004$  在烟草上激活 HR 反应时必须的。

为了进一步验证  $Xcc8004$  在烟草上产生的 HR 是否是  $HpaA_{Xcc8004}$  本身激活的, 笔者在烟草上分别接种了携带  $HpaA$ -pER8 的农杆菌、pER8 空载体的农杆菌 GV3101。接种后 24 h, 用雌激素喷洒于叶片上诱导蛋白表达, 结果表明, 注射了携带  $HpaA$  的农杆菌侵染烟草后并不能使烟草产生 HR(图 6), 说明  $Xcc8004$  在烟草上产生的 HR 并不是  $HpaA_{Xcc8004}$  自身使烟草产生 HR, 很有可能是  $HpaA$  的缺失影响了  $Xcc8004$  其他一些效应蛋白的功能。

2.6  $HpaA_{Xcc8004}$  定位于细胞核 辣椒斑点病菌  $Xcv$  中的  $HpaA_{Xcc85-10}$  定位在植物细胞核内, 而  $HpaA_{Xcc8004}$  也具有 2 个推测的核定位序列, 为了进一步研究  $HpaA$  的功能, 笔者对  $HpaA_{Xcc8004}$  在植物细胞中的定位进行了探索。分别将由氯化铯梯度离心大量提取的质粒  $HpaA$ -gfp-pUC19、gfp-pUC19 导入拟南芥原生质体中, 过夜表达。经共聚焦显微镜观察发现  $HpaA_{Xcc8004}$  定位在细胞核中, 而单独的 GFP 蛋白则分散在细胞各处(图 7)。

2.7  $HpaA_{Xcc8004}$  转基因植株可以减弱 DC3000 和  $Xcc8004$  在拟南芥上发黄的表型 为了进一步探索  $HpaA_{Xcc8004}$  本身在植物体内的功能, 笔者构建了  $HpaA_{Xcc8004}$  的拟南芥转基因植株。用  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  雌激素喷洒在转基因植株的叶片上 24 h 后, 将假单胞菌 DC3000,  $Xcc8004$  分别接种于拟南芥野生型 Col-0 和  $HpaA_{Xcc8004}$  转基因植株的叶片上 6 d 后观察结果。结果显示, 转基因植株的发黄症状弱于野生型的(图 8), 说明  $HpaA_{Xcc8004}$  蛋白本身可以减弱由 DC3000,  $Xcc8004$  引起的拟南芥发黄的表型。



图 4  $HpaA_{Xcc8004}$  对于  $Xcc8004$  在甘蓝、萝卜、白菜的完整毒性

将  $Xcc8004$  和  $\Delta HpaA$  利用剪刀剪切的方法分别接种京丰 1 号(jingfeng1)、中甘 21 号(zhonggan21)、常丰四九菜心(changfengcaixin)和板叶红袍(banyehongpao), 接种 7 d 后进行拍照。图中左边一列为接种  $Xcc8004$  的表型, 右边一列为接种  $\Delta HpaA$  的表型

Fig. 4  $HpaA$  is required for the full virulence of  $Xcc8004$  in Cabbage and Radish

WT  $Xcc8004$  and  $\Delta HpaA$  mutant were inoculated onto Cabbage jingfeng1, zhonggan21, changfengcaixin and Radish banyehongpao. Disease symptoms were photographed 7 days after inoculation

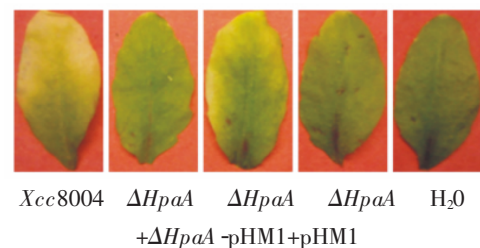


图 5  $HpaA_{Xcc8004}$  对于  $Xcc8004$  在拟南芥上的完整毒性

$Xcc8004$ ,  $\Delta HpaA$ , 互补了  $HpaA$ -pHM1 的  $\Delta HpaA$ , 互补了空载体 pHM1 的  $\Delta HpaA$  菌株接种于拟南芥叶片, 接种纯水作为对照, 图片拍摄于接种 6 d 后

Fig. 5  $HpaA$  is required for the full virulence of  $Xcc8004$  in Arabidopsis.

Four strains,  $Xcc8004$ ,  $\Delta HpaA$ ,  $\Delta HpaA$  containing  $HpaA$ -pHM1 and  $\Delta HpaA$  containing pHM, and water were injected respectively into Arabidopsis leaves. Water was used as control. Disease symptoms were photographed 6 days after inoculation

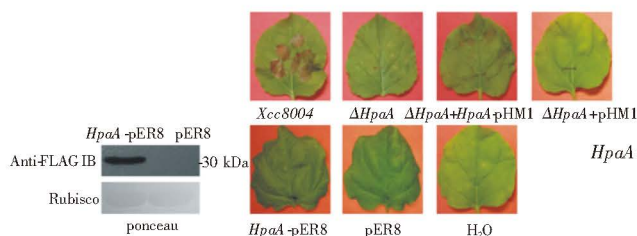


图 6  $HpaA_{Xcc8004}$  对于  $Xcc8004$  在烟草上引起的超敏反应

$Xcc8004$ 、 $\Delta HpaA$ 、互补了  $HpaA$  pHM1 的  $\Delta HpaA$ 、互补了空载体 pHM1 的  $\Delta HpaA$ 、携有  $HpaA$  pER8 的农杆菌、携有 pER8 空载体的农杆菌注射于烟草叶片, 图片拍摄于接种 4 d 后。  $HpaA_{Xcc8004}$  的表达用 anti FLAG 检测。

Fig. 6  $hpaA$  is required for

the  $Xcc8004$ -triggered HR in tobacco leaves

Six strains and water were injected respectively into tobacco leaves. Leaves inoculated by GV3101 containing  $hpaA$  pER8 or pER8 were treated by oestrogen. Photographs were taken on 4 days post inoculation. The expression of  $HpaA_{Xcc8004}$  was detected by anti FLAG immunoblot.

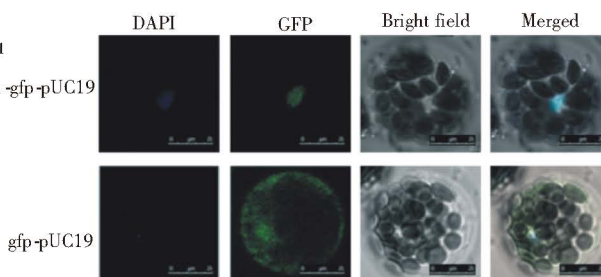


图 7  $HpaA_{Xcc8004}$  的亚细胞定位

将  $HpaA$ -gfp-pUC19、gfp-pUC19 导入拟南芥原生质体中, 18 h 后用共聚焦显微镜观察并拍照, 绿色的为绿色荧光蛋白, 蓝色的为核染料 DAPI 染色, 比例尺为 5  $\mu m$

Fig. 7 Subcellular localization studies with  $HpaA_{Xcc8004}$

The vectors  $gfp$ -pUC19 and  $HpaA$ -gfp pUC19 under control of the 35S promoter, respectively, were transformed into Arabidopsis protoplasts. The protoplasts were observed and photographed by using the confocal microscopy 18 hours after transformation. GFP fluorescence is shown in green and DAPI staining of nuclei in blue. The size bar is 5  $\mu m$

### 3 讨 论

$HpaA$  是一个广泛存在于黄单胞菌中的蛋白质。本研究以  $Xcc8004$  的  $HpaA$  基因为研究对象, 发现  $HpaA_{Xcc8004}$  蛋白的分泌依赖于  $Xcc8004$  的 III 型分泌系统, 并且  $HpaA_{Xcc8004}$  定位在植物细胞核内。在与植物相互作用的过程中, 发现  $HpaA$  的缺失会造成  $Xcc8004$  在甘蓝、萝卜、拟南芥中致病力的下降, 并且导致烟草 HR 的丧失, 这些结果与  $Xcv$  中的  $HpaA$  蛋白的功能和定位相一致, 说明  $HpaA$  的作用机理在黄单胞菌属中可能非常保守。文献 [10] 的研究结果表明, 在辣椒斑点病菌中,  $HpaA$  与  $HpaB$  可以发生相互作用, 从而调控 III 型分泌系统 Pilus 蛋白、易位子蛋白以及效应蛋白的分泌, 主要可以调控 HrpE, HrpF, XopA, AvrBs3, XopC 和 XopJ 的分泌, 然而关于  $HpaA$  在植物体内的功能却未曾报道过。笔者在烟草上单独表达  $HpaA_{Xcc8004}$ , 发现  $HpaA_{Xcc8004}$  本身并不能激活 HR。笔者进一步构建了  $HpaA_{Xcc8004}$  的拟南芥转基因植株, 发现  $HpaA_{Xcc8004}$  转基因植株可以减弱 DC3000 和  $Xcc8004$  在拟南芥上发黄的表型, 说明  $HpaA_{Xcc8004}$  被分泌到植物细胞中并发挥了功能。至于  $HpaA_{Xcc8004}$  是通过什么机理造成了这种变化, 在植物体内还会发挥哪些功能, 目前尚不清楚, 还有待进一步研究。

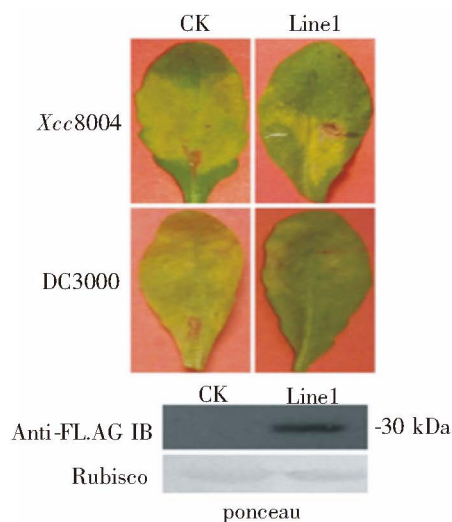


图 8  $HpaA_{Xcc8004}$  可以减弱 DC3000 和  $Xcc8004$  在拟南芥上发黄的表型

CK: 拟南芥野生型 Col-0, Line1:  $HpaA$  转基因植株。DC3000,  $Xcc8004$  分别注射于 Col-0 和  $HpaA$  转基因植株叶片, 图片拍摄于接种 6 天后,  $HpaA_{Xcc8004}$  的表达用 anti-FLAG 检测

Fig. 8  $HpaA_{Xcc8004}$  can reduce the chlorosis symptoms in Arabidopsis caused by DC3000 and  $Xcc8004$

CK: Col-0, Line1:  $HpaA$  transgenic plant. DC3000 and  $Xcc8004$  were injected respectively into Arabidopsis thaliana Col-0 and  $HpaA$  transgenic plant. Photographs were taken 6 days after inoculation. The expression of  $HpaA_{Xcc8004}$  was determined by anti-FLAG immunoblot

## 参考文献:

- [1] LEYNS F , DE CLEENE M , SWINGS J , et al. The host range of the genus *Xanthomonas* [J]. *Bot Rev* 1984 50: 305 – 355.
- [2] CHAN JW , GOODWIN PH. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris* [J]. *Biotechnol Adv* ,1999 17: 489 – 508.
- [3] HENDERSON IR , NAVARRO F , Nataro J P , et al. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins [J]. *Trends Microbiol* 1998 6( 9) : 370 – 378.
- [4] BÜTTNER D , NOËL L , STUTTRNANN J , et al. Characterization of the non-conserved hpaB-hrpF region in the hrp pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007 20: 1063 – 1074.
- [5] HE S Y , NOMURA K , WHITTAM T S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens [J]. *Biochim Biophys Acta* 2004 1694: 181 – 206.
- [6] TAMPAKAKI A P , FADOULOGLOU VE , Gazi AD , et al. Conserved features of type III secret [J]. *Cell Microbiol* , 2004 6( 9) : 805 – 816.
- [7] BÜTTNER D , BONAS U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell [J]. *EMBO J* , 2002 , 21: 5313 – 5322.
- [8] BÜTTNER D , LORENZ C , WEBER E , et al. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. *Mol Microbiol* , 2007 , 59: 513 – 527.
- [9] BÜTTNER D , GÜRLEBECK D , NOEL LD , et al. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion [J]. *Mol Microbiol* 2004 54: 755 – 768.
- [10] CHRISTIAN L , OLIVER K , MONIQUE E , et al. HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion [J]. *Molecular Microbiol* , 2008 69( 2) : 344 – 360.
- [11] WEI QIAN , YANTAO JIA , SHUANGXI REN , et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. *Genome Research* 2005 15: 757 – 767.
- [12] WINDGASSEN M , URBAN A , JAEGER KE. Rapid gene inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Federation of European Microbiological Societies( FEMS) Microbiology Letter* 2000 193: 201 – 205.
- [13] 高英杰 赵红桃. 优化的密度梯度离心法提取质粒 DNA [J]. *衡水学院学报* 2014 2( 04) : 49 – 51.
- [14] 孙琳琳 侯少明 侯和胜. 拟南芥叶肉原生质体分离条件的优化 [J]. *植物生理学通讯* 2009 03: 282 – 284.
- [15] BÜTTNER D , BONAS U. Port of entry-the type III secretion translocon [J]. *Trends Microbio* 2002 10: 186 – 192.
- [16] 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 [J]. *Mol Microbiol* 2000 38: 828 – 838.
- [17] WANG LF , TANG XY , HE CZ , et al. The bifunctional effector AvrXccC of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires plasma membrane-anchoring for host recognition [J]. *Mol Plant Pathol* 2007 8: 491 – 501.

## Functions of Gene *HpaA* in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

ZOU Jun , RONG Wei , LI Huiping , LIN Daozhe , HE Chaozu

( Hainan Key Laboratory of Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

**Abstract:** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ( *Xcc* ) , a Gram-negative plant pathogenic bacterium , can cause black rot diseases on crucifer plants , including cabbage , radish and Arabidopsis. *Xcc* secretes effector proteins into plants via the type III secretion system to help its infection and reproduction. HpaA protein widely exists in *Xanthomonas* , and it has been reported that HpaA<sub>Xcc85-10</sub> is a type III effector and participates in other effector secretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( *Xcv* ) . *Xcc* contains the HpaA protein homologue. However , it is not clear whether the HpaAXcc protein can be secreted in type III secretion system , and the mechanism of hpaAXcc remains unclear. In this study , secretion assay indicated the HpaA<sub>Xcc8004</sub> protein secretion was type III secretion system dependent. Subcellular localization assay indicated that HpaA<sub>Xcc8004</sub> was located in the plant cell nucleus , which was consistent with HpaA<sub>Xcc85-10</sub> protein location in plants. In addition , the deletion mutant of *HpaA* gene was achieved by means of homologous recombination , and the deletion mutant caused reduced symptoms in cabbage , radish and Arabidopsis thanliana , which indicated that HpaA<sub>Xcc8004</sub> was required for the *Xcc8004* complete toxicity in the host plants. Furthermore , in the *HpaA* transgenic Arabidopsis , HpaA<sub>Xcc8004</sub> can perform its function to reduce the chlorosis symptoms caused by *Pseudomonas DC3000* and *Xcc8004*.

**Key words:** *Xcc8004*; type III secretion system; gene *HpaA*