

根癌农杆菌致病基因及其生物学功能分析

陆小平^{1*} 许雅香¹ 小岛峰雄²

¹(苏州大学农业科学与技术学院 苏州 215006)

²(日本信州大学纤维学部 长野 上田)

摘 要 用转座子标签技术克隆了位于农杆菌(A-208 株)染色体上的致病基因 *acvB*、*abvA*、*chuA* ,简单介绍克隆技术的研究思路和策略。染色体基因是农杆菌吸附到植物细胞表面所必需的基因,当某一基因发生突变时,就不能完成贴壁反应而失去毒性。由于转座子 Tn5 的插入,导致染色体毒性基因失活,最终使农杆菌感染后的受体细胞不能致瘤。用实验证据阐述各基因在 T-DNA 形成、转移、整合、表达等过程中担负的重要作用。对延宕至今的 T-DNA 穿壁问题作了推测 植物细胞壁表面可能存有 T-DNA 的天然穿壁孔道。

关键词 转座子(Tn5), 农杆菌, 致病基因, T-DNA 转移

中图分类号 Q75 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)06-0651-04

转座子是存在于染色体 DNA 上可自主复制和移位的 DNA 序列,它可以通过自身剪切、转移、整合等过程从基因组的一个位置跳跃至另一个位置,由于转座子的跳跃,引起了插入位点的基因突变,从突变株的基因文库中筛选出带有该转座子的克隆,再利用这部分序列从野生型基因文库中克隆得到完整的目的基因^[1]。1993 年,小岛研究室的成员利用转座子标签技术,成功地分离和克隆了一个位于野生型农杆菌(A-208)染色体上的致病基因 *acvB*。近年来,又从农杆菌染色体中分离出 2 个与致病有关的基因,并得到了几个丧失致病能力的变异株。本文结合其中的部分工作,对该技术的研究思路作一概述,为植物基因工程的基础研究提供参考。

1 转座子标签的研究策略

以携有转座子 Tn5 的大肠杆菌 A-32(PJB4J1)为供体菌;野生型农杆菌(A-208)为受体菌,将 A-32 和 A-208 分别置 LB 液体培养基中培养,在含有卡那霉素、庆大霉素和利福平的选择平板上,选出转化子。将这些转化子菌液分别接种于胡萝卜根切片表面,2~3 周后,调查胡萝卜切片接种表面肿瘤的大小和有无。通过两次 5000 余个单菌落的接种筛选,共得到 6 个不能致瘤的变异菌株,编号分别为 B-119、B-139、B-140、B-240、B-244、B-248。为了进一步验证本次的结论,又用这 6 个变异菌株对紫景天的茎、叶再次接瘤试验,结果与胡萝卜切片试验完全相同。由此可推定这 6 个变异菌株可能是转座子(Tn5)插入引起了农杆菌遗传背景的改变。

在 6 个变异株中,为了确定各自的 Tn5 插入靶位,从变

异株中同步抽提质粒 DNA 和染色体 DNA,精制后在琼脂糖凝胶板上电泳 2h,由于质粒 DNA 和染色体 DNA 分子量大小不等,其迁移率也不同,经印迹、杂交(以 ³²P-Tn5 为探针),可根据杂交带出现的位置确定 Tn5 插入的位点^[2]。

2 致病基因的分离

变异株总 DNA 分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶解后,将酶切片段连接到 pUC18 多克隆位点,在选择平板上筛选重组子,用 ³²P-Tn5 探针针对重组 DNA 进行分子杂交,以确定 Tn5 的有无。再根据 pUC18DNA 多克隆位点的已知序列,设计一段 20bp 引物对重组 DNA 测序分析,便可求得 Tn5 插入位点及两侧序列,将所得序列与已知基因序列进行同源性分析,以此分离出相关基因。根据上述研究,变异株中 Tn5 插入位点列表如下:

表 1 Tn5 插入位点
Table 1 Tn5 insertion sites

编 号	B-119	B-139	B-140	B-240	B-244	B-248
部 位	染色体	染色体	染色体	Ti-质粒	Ti-质粒	Ti-质粒
基因位点	<i>acvB</i>	<i>chuA</i>	<i>chuB</i>	<i>virA</i>	<i>tms</i>	<i>abvA</i>

3 致病基因的鉴定

3.1 *acvB* 基因

从 B-119 中分离带有 Tn5DNA 片段,对其亲本 A-208 进

收稿日期 2003-05-06,修回日期 2003-07-28。

基金项目 国家教育委员会国家留学基金资助(No. 99832077)。

* 通讯作者。 Tel 86-512-67606493; Fax 86-512-66710118; E-mail szcp@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

行同源重组,结果 A-208 表现为无毒性;用限制酶 *Kpn* I 和 *Sal* I 从质粒中切下 *acvB* 片段,再将该片段导入 B-119,结果 B-119 毒性得到恢复。测序结果表明:*acvB* 基因开始于 ATG 终止于 CGC。跨度为 1347bp,在起始密码上游 7 位存有 SD 序列;从 +1 ~ +72 位为信号肽序列;+73 ~ +129 位为 *AcvB* 蛋白的 N 末端序列,而 Tn5 是插入于 +535 与 +536 之间^[3]。

3.2 *chwA* 基因

用携带 *chwA* 基因的大肠菌(A-61/pCD523)与辅助质粒(A-67/pRK0132)及受体菌 B-139 进行三亲杂交,在含有抗生素的选择平板上筛选单菌落,再将该菌体对紫景天的茎或叶接瘤试验,结果 B-139 毒性得到恢复。B-139 由于染色体上的 *chwA* 基因被 Tn5 插入,更改了 *chwA* 基因的阅读框架,使其不能编码出相应的产物,从而失去了原有的生物学功能,最终导致 T-DNA 在向宿主细胞转移的过程中出现了障碍或阻断^[4]。

3.3 *virA* 基因

以具有完整 *virA* 基因的 A-208 质粒 DNA 为模板,用上游引物(5'-GCGCGGAGTCAAAGAACACCTCGG-3')和下游引物(5'-TCAGCCAACACCCGCCACGCAGAAAG-3')进行 PCR 扩增,扩增出 2.8kb 片段。产物精制后,连接到穿梭载体 pUCD2 中,再将该重组质粒导入 B-240,经紫景天茎和胡萝卜根接种试验,B-240 毒性得到恢复。从 B-240 中克隆插入 Tn5 的 *virA* 基因,经测序及同源性分析,新克隆 *virA* 基因(2501 bp)与已知 *virA* 基因序列有 99% 的同源性^[5]。

3.4 *abvA* 基因

这是一个位于质粒 DNA 上刚发现的致病基因,从 B-248 中克隆带有 Tn5 的基因片段,经测序及同源性分析,在 A-208/pTiC58 的已知基因中尚未检索到与新克隆的基因片段具有相近同源性的序列,故暂称为 *abvA* 基因。其跨度为 1949bp,该基因有 3 个开放阅读框架,大小分别为 ORF1:355 bp(+1 ~ +355) ORF2:260 bp(+889 ~ +1049) ORF3:300bp(+1147 ~ +1947),Tn5 插入于 +4 与 +5 之间^[2]。

3.5 *tms* 基因

tms 基因位于 T-DNA 区域内,当 Tn5 插入该区域后导致毒性明显减弱但未丧失。采用上述方法,从 B-244 中克隆的基因片段,经测序及同源性分析,与已知 *tms* 基因序列有 98% 的同源性。

4 T 链形成和转移

目前,在农杆菌染色体上已克隆和鉴定了 10 个与 T-DNA 剪切、复制、转移有关的基因,并对各基因的生物学功能进行了描述和推测。有资料表明,染色体基因是农杆菌吸附到植物细胞表面所必需的基因,当某一基因发生突变时,就不能完成贴壁反应而失去毒性^[6]。由于转座子 Tn5 的插入,敲除了染色体毒性基因,最终使农杆菌不能致瘤。但丧失毒性是致瘤基因受阻于①T 链能否形成;②T 链形成后能否及时转移;③T 链如何穿越细菌、宿主细胞的壁和膜系统;④T

链如何进入细胞核等环节中的哪一步?为了究其原因,小岛研究室的成员重点对 *acvB* 基因和 *chwA* 基因作了探讨,进一步验证它们在 T-DNA 转移中担负的重要角色。

4.1 T 单链的形成及检测

B-119、B-139 因 *Vir* 区域未受转座子插入,仍保持正常 *vir* 功能,用乙酰丁香酮(AS)活化 B-119、B-139 的 *vir* 基因操纵子系统后,便能在其中测到 T 单链,且该条单链来自于 T-DNA 的下链。这一结论可用 T-DNA 双链探针、T-DNA 上链探针和 T-DNA 下链探针进行 Southern 杂交给予证明。提取经 AS 诱导后的 A-208、B-119 总 DNA,电泳后在非变性的条件下印迹于尼龙膜,用上述三种探针杂交后,A-208、B-119 在 T-DNA 下链探针区都显示出杂交信号,其余两种探针区未有信号产生。T 单链用核酸酶处理后又被降解,杂交时也无信号出现。这一结果表明,T-DNA 是剪切下方的一条链经包装后再转移的。同时也表明 B-119 中的 *acvB* 基因、B-139 中的 *chwA* 基因插有转座子后不影响 T 单链的生成^[7]。

4.2 T 单链的包装

T 单链形成后需经包装方能转移,一方面可以改变 T 链构象,缩小体积;另一方面还可以免遭核酸酶降解,提高转移效率。目前,T 链转移形态能被学者接受的是 T 链复合物,即 *VirD2* 蛋白与 T 链 5' 末端共价结合,其余部分由 *VirE2* 蛋白包被形成细长的 T 链蛋白复合物,但至今这种复合物在植物细胞中尚未测到^[8]。我们认为这并非是唯一模式,可能还有其它蛋白(如 *AcvB* 蛋白、*VirF* 蛋白)参与。证据有二:一是用免疫法曾检测到 *AcvB* 蛋白和 T 链的复合物^[9];二是用 *acvB* 蛋白和 ³²P 标记的 T 链复合物与番茄原生质体共培养,转化效率比只用 T 链培养时提高 7 倍^[7]。

4.3 T 单链的转移

T 链转移的第一步是 T 链复合物穿越细菌细胞的内膜和外膜,然后穿越由 *virB* 基因产物构筑的分子通道。最近的研究表明,*acvB* 蛋白(47kD)和 *ChvA* 蛋白(65kD)也参与了穿越过程。下面的实验结果可以佐证这一点:用 *acvB* 基因插入表达载体(PMW24),使其在大肠杆菌中表达,用免疫沉淀法测定 *acvB* 基因产物的淤积场所,结果发现,大肠菌的外周质中存有大量 *AcvB* 蛋白和与 T 链结合的复合物^[7]。因此,*acvB* 基因产物可能是一种跨膜蛋白。另外,从下面的实验也找到 2 个间接证据:1)在添加 AS 的培养基中培养 A-208、B-119、B-139,利用 SDS 电泳分析 3 种菌体外膜的蛋白组分,结果发现在 5 ~ 15 kD 区域内 3 种菌体的蛋白组分有明显差异,B-139 出现 2 条淡色泳带,B-119 出现 2 条深色泳带;A-208 出现 7 ~ 8 条泳带。2)用扫描电镜观察上述 3 种菌体形态,其结果为 B-139 缺失性线毛,B-119 性线毛不完整;A-208 有较长的性线毛^[4]。以上的研究间接证明了因 *acvB* 基因和 *chwA* 基因突变引起蛋白组分和菌体形态发生差异,丧失或削弱 *AcvB* 蛋白和 *ChvA* 蛋白在 T 链穿越中的重要作用,最终导致 B-119、B-139 不能致瘤。与此相关的直接证据也有两点:1)用含有 β -半乳糖苷酶(*GUS*)基因的植物表达载体 *IG24-Hm* 导入 B-119 菌株,然后用转化菌对紫景天叶片接

种 3 天后检测叶片内 GUS 的瞬时表达量,结果叶片内未测到 GUS 活性,但用烟草原生质体作 pIG121-Hm 受体时,却测到了较高的 GUS 活性。由此说明,T 链转移受阻于植物细胞壁,可能正是由于 *acuB* 基因突变的缘故。

5 T-DNA 的瞬时表达

T-DNA 导入宿主细胞后,大部分并未插入到染色体上,而是以游离状态存在于细胞核内,这些游离态 DNA 常发生构象变化,并在核内转录产生 RNA。但这种转录维持不长,T-DNA 在细胞核内滞留时间过长,将会被核酸酶所降解^[10],届时转录也随之消失。当 T-DNA 从到达细胞核至未被降解前的时间段内(3~10d),常常会在宿主细胞内进行瞬时表达。根据这一原理可以对相关基因的功能作进一步分析。

将植物表达载体 pIG121-Hm 导入 A-208、B-119、B-139、B-240、B-244、B-248,用同时添加潮霉素、利福平、卡那霉素的平板选择转移接合子,再用该菌体对紫景天叶片接种,每隔 48 h 用荧光比色法测定叶片汁液中 GUS 的瞬时表达量。由于 pIG121-Hm 中的 GUS 基因插有一个内含子,使得该基因只能在真核生物中表达,而不能在原核生物中表达,这样,由叶片测得的 GUS 活性皆为 T-DNA 的瞬时表达量,排除了农杆菌 GUS 的污染。由表 3 可知,B-119、B-139 的表达量很低,可能与 T-DNA 未能转移至细胞核有关,这与上文提及的 T-DNA 受阻于穿壁或穿膜过程是相吻合的。B-240、B-244、B-248 的表达量较高,说明 T-DNA 能正常转移至细胞核内,但不能致瘤可能是整合阶段出现障碍。

表 2 紫景天叶片 GUS 的瞬时表达(4-甲基伞形酮 pmol/min/mg 酶)

Table 2 GUS activity in extracts from *K. daigremontiana* leaves inoculated with various strains of *A. tumefaciens* harboring pIG121-Hm (pmol of 4-methylumbelliferone/min/mg protein)

Strain	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
A-208	0	40 ± 25.1	73 ± 25.1	239 ± 146	159 ± 75
B-119	0	0.5 ± 0.5	0	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2
B-139	0	0.9 ± 0.8	0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
B-240	0	46.3 ± 27.2	70.6 ± 56.0	132 ± 43.0	100 ± 63.0
B-244	0	23 ± 11.8	47.0 ± 24.9	22.7 ± 12.0	13.0 ± 8.5
B-248	0	36 ± 19.0	58.0 ± 30.0	68.0 ± 46.0	47.0 ± 33.0

6 T-DNA 的整合

T 链整合是转化的另一阶段,T 链插入位点没有特定的位置,但一致认为转录的活性部位是 T 链插入的最适位点,因为这些区域常常发生局部松弛,更容易与外源 DNA 互作^[11]。有研究表明,T-DNA 的左侧序列在整合过程中表现有更高的精确性^[12],在 T-DNA 和植物基因组靶位 DNA 之间的序列虽然发现有充分的同源性,但是,T-DNA 和受体 DNA 至少要有 20bp 的 DNA 序列完全同源和合适的调控系统,才能具备整合的基本条件^[13]。且同源片段多,整合容易发生。

这就解释了转化频率高低依赖于植物基因型的原因。

用导有 pIG121-Hm 的变异菌株接种烟草培养细胞,调查烟草培养细胞中 T-DNA 的整合情况。结果显示,B-119、B-248 均未产生卡那霉素抗性细胞,B-240 出现少量抗性细胞,B-244 和 A-208 出现较多的抗性细胞。这一结果说明 B-244 虽然 Tms 插有转座子,但它仍与 A-208 一样,完成 T-DNA 向宿主染色体整合过程,使转化细胞出现卡那霉素抗性。而其它转化细胞未出现抗性是因为 T-DNA 没有得到整合。

综上所述,野生型农杆菌的染色体 DNA 或质粒 DNA 由于 Tn5 插入,改变了农杆菌的遗传背景,使其丧失了原有的毒性。染色体基因(*acuB*、*chuA*、*chwB*)发生变异时,T-DNA 在穿越壁膜阶段便受到阻碍,质粒基因(*virA*、*abvA*)变异时,整合阶段将发生障碍,瘤基因(*tms*)发生变异时,不影响 T-DNA 的转移和整合,只是影响植物瘤的形成。

7 推测与展望

当 T 链复合体穿过细菌细胞壁膜后,进入下一阶段的最大屏障应是植物细胞壁。目前,关于跨越植物细胞壁的机制了解得不多,但研究者以支持 VirB 蛋白组成的运动载体机制为多,除此之外是否还有其它运输机制呢?从植物细胞的形态特征和解剖构造分析,植物细胞的壁蛋白是否协同 T-DNA 的进入,细胞壁表面的纹孔是否能成为 T-DNA 的天然通道。其理由是:T 链复合体的孔径为 2nm,而纹孔直径是 30~60 nm(等于胞间连丝的直径)^[14],该孔径足以满足 T 链复合体的穿过,但目前毫无这种可能性存在的证据,只是清楚植物感染病毒时,纹孔或细胞连丝是病毒 DNA 的通道^[15]。结合我们的研究,试作如下推测:农杆菌细长的性线毛构成了细菌与受体细胞的粘附器,它在贴壁反应中起重要作用,贴壁反应一旦完成,性线毛很快在受体细胞的表面寻找穿越障碍最小的薄弱点——纹孔,此时,由于受体细胞正处于感受状态,纹孔膜容易被性线毛的末端蛋白所降解,或末端蛋白容易在膜上驻留。然后,以类似于细菌转导过程的方式,将 T-DNA 注射到植物细胞内。Dudlis 等在研究农杆菌附着植物细胞机理中观察到植物细胞表面有位数不多的农杆菌“附着点”,在附着的初期,许多细菌会发生竞争附着^[16],这种“附着点”是否与纹孔有关需作研究。

当 T 链复合体越过第一屏障后,余下的过程就显得容易了,因核孔直径较 T 链大 4~5 倍(9~10nm),质膜、核膜中的镶嵌蛋白经 T 链复合体的引导,发生构象改变,最终成为 T-DNA 越过的通道。但 T-DNA 是以 T 链复合体进入核内还是以 T 单链进入核内至今尚不明了。如果是前者又是如何解离为 T 单链去完成整合或进行瞬时表达呢?直接导入法否定了 T 链复合体的整合过程。

研究中分离出的 B-244 菌株,无论是染色体基因还是质粒基因都保持着原有的生物功能,仅致瘤基因中的 *tms* 被转座子插入而失活。根据 B-244 具有的特性:①含有 T-DNA 剪切、转移、整合的全部基因;② *tms* 基因因转座子插入而失活;③胭脂碱合成基因仍被保留。我们设想,用 B-244 菌代

替 LBA4404,以武装载体代替卸甲载体,可作为更有效的外源基因载体加以开发利用,建立与其配套的转化系统,为实现农杆菌介导的外源基因高效转化提供另一途径。近年来,我们用 B-244 构建的工程菌对荞麦、牵牛花、桑树幼苗进行了整体转化试验,短期内得到了一些转化体。这一转化系统大大简化了转导程序,省去了组织培养的繁琐步骤,能转化许多受体材料的生长点和分生组织细胞,拓展了农杆菌转化的应用范围。

REFERENCES(参考文献)

- [1] YANG I(杨琳),WANG J H(王金发). Transposon for plant genetic engineering. *Biotechnology(生物技术)* 2000 **10**(1):22-27
- [2] Parimal MAJUMDER, Hidenari SHIOIRI, Masayuki NOZUE, Mineo Kojima. Isolation and characterization of a new virulence(*abvA*) of *Agrobacterium tumefaciens*. Reprinted from *Journal of General Plant Pathology*. 2001 **67**(2):124-133
- [3] LU X P(陆小平),ZHENG X J(郑小坚), Mineo Kojima(小岛峰雄). Expression and cloning of *AcvB* gene. *Bulletin of Biology(生物学通报)* 2002 **37**(5):6-16
- [4] Parimal MAJUMDER, Kenichiro TAKAGI, Hidenari SHIOIRI, Masayuki *et al.* Functional analysis of two chromosomal virulence genes *chwA* and *acvB* of *Agrobacterium tumefaciens* using avirulent mutants with transposon 5 insertion in the respective gene. *Ann. Phytoathol. Soc. Jpn.* 1999 **65**(3):254-263
- [5] PARIMAL MAJUMDER, HISASHI YOSHIDA, HIDEMARI SHIOIRI *et al.* M-31 Mutant(*virA*:Tn5) of *Agrobacterium tumefaciens* is capable of transferring its T-DNA into the nucleus of cell, but incapable of integrating it into the chromosome. *Journal of Biocience and Bio-engineering*. 2000 **90**(3):328-331

- [6] XIA Y W(夏英武),WU D X(吴殿星),SHU Q Y(舒庆尧). Transferring genes into plants by *A. tumefaciens* T-DNA. *Journal of Biotechnology(生物学杂志)*,1994 **61**(5):7-12
- [7] Mineo Kojima(小岛峰雄). The molecular mechanism of the crown gall's inducement(クラウンゴ-ル誘導の分子機構). *Science Journal(Japan)*,1995 **65**(3):171-180
- [8] LI W(李卫),GUO G X(郭光沁),ZHENG K C H(郑国辑). Progress of Plants Genetic Transformation by *Agrobacterium*. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* 2000 **45**(8):798-807
- [9] Uritani IKUZO(瓜谷郁三). The threat in plant biochemistry and molecular biology(ストレスの植物生化学・分子生物学)(Japan) 2001 pp.265-278
- [10] XU M I(徐明良),YANG J S H(杨金水),GE H I(葛和麟). Mechanism of exogenous gene integration in plants. *Plant physiology Communications(植物生理学通讯)*,1996 **32**(3):234-240
- [11] YE J M(叶健明),TANG K X(唐克轩),SHEN D I(沈大棱). The methods for transferring genes into plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences(生命科学)*. 1999 **11**(2):58-60
- [12] WANG J X(王景雪),SUN Y(孙毅). Progress of plants genetic transformation by *agrobacterium*. *Biotechnology Information(生物技术通报)*,1999 **15**(1):7-13
- [13] WANG C I(王从丽),LU B F(陆柏方),ZHANG X CH(张学成). Molecular Basis of *Agrobacterium-Plant* gene transfer. *Chinese Bulletin of Life Sciences(生命科学)* 2002 **14**(1):1-5
- [14] XU H Q(徐汉卿). The botany, Beijing Chinese Agriculture Press, 2000 pp.8-66
- [15] GU F Z(顾方舟),LU S I(卢圣栋). The present and future of biotechnology. Beijing PUMC & BMU press,1999
- [16] WANG G I(王关林),FANG H J(方宏筠). The techniques and methods of the plant gene engineering. Beijing Science Press, 1998

Virulence Genes of *Agrobacterium tumefaciens* and Analysis Function of its Biology

LU Xiao-Ping^{1*} XU Ya-Xiang¹ Mineo Kojima²

¹(School of Agricultural Science and Technology Soochow university, Suzhou 215006)

²(Faculty of Textile Science, Shinshu University, Ueda 386-8567, Japan)

Abstract Chromosomal virulence genes *acvB*, *abvA*, *chwA* of *Agrobacterium tumefaciens* were cloned with the technique of transposon 5 insertion. The chromosome genes are necessary for *Agrobacterium tumefaciens* absorbing to cell ular surface of plant, the adherence reaction can't be executed and result in losing the toxicity if mutations are occurred in some chromosome genes. The chromosome toxicity gene is inactivated due to transposon Tn5 be inserted and the accept ant cell infected with *Agrobacterium tumefaciens* can't cause tumor ultimately. This article briefly introduces the research way of thinking and strategy of this technique and the important roles of every gene, which are taken of in the process of T-DNA's form, transfer, integration, and expression *etc.* This article also gives a presumption to T-DNA's transport: The plant cell wall's porin may be T-DNA's natural channel.

Key words transposon5, *A. tumefaciens*, virulence genes, T-DNA transport