

# 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 8004 菌株 *wxcA* 基因与 EPS 的产量有关

陆光涛 唐纪良\* 危广宁 何勇强 陈保善

(广西大学分子遗传研究所, 南宁 530005)

**摘 要** 在以前的工作中,采用转座子 Tn5<sub>gusA5</sub> 对野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xcc*)8004 菌株进行诱变,获得一批胞外多糖(EPS)合成减少的突变体,对这些突变体的 Tn5<sub>gusA5</sub> 的插入位点进行分析后,发现有两株突变体是 *wxcA* 基因不同插入位点的突变体。以前认为 *wxcA* 基因与脂多糖(LPS)的 O-抗原合成有关而与 EPS 的合成无关。为明确 *wxcA* 基因的功能,对 8004 菌株的 *wxcA* 基因进行缺失,获得的  $\Delta wxcA$  突变体的 EPS 产量与野生型菌株相比,减少了 50%,并且一段 PCR 合成的包含 *wxcA* 基因的 DNA 片段能反式互补  $\Delta wxcA$  突变体,恢复突变体的 EPS 产量。这证实了 8004 菌株的 *wxcA* 基因与 EPS 的合成产量有关。

**关键词** 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种, *wxcA* 基因, 胞外多糖

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2004)04-0477-07

黄原胶(Xanthan gum)是由野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 简称 *Xcc*)所产生的一类胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS),由于具有独特的流变性、良好的水溶性以及对酸、碱、热稳定和具有对各种盐类良好的相容性,作为增稠剂、乳化剂、稳定剂等广泛应用于石油、食品、纺织等 20 多个行业<sup>[1,2]</sup>,是目前世界上仅次于抗生素类和溶剂类产品的第三大类发酵产品。

由于黄原胶具有巨大的商业价值,人们对黄原胶的生物合成机理也作了大量的研究,希望通过对黄原胶生物合成机理的了解,最终使人们可对黄原胶合成的产量和质量进行控制,生产出具有良好理化特性的黄原胶,或者是能够改变一些发酵成本低廉的非野油菜黄单胞菌的菌种的代谢途径,使这些菌种能够生产黄原胶,从而大大降低黄原胶的生产成本。经过多年的研究,目前已知染色体的 *xps* III, *xps* IV, *xps* VI 区域和一个 35.3kb 的基因簇的基因编码产物与合成黄原胶所需的前体糖核苷等衍生物的形成有关,*xps* I 区域即 *gum* 基因簇基因产物与构成黄原胶的五糖重复单元的顺序性组装、残基修饰、重复单元间的聚合以及黄原胶的分泌有关<sup>[3-6]</sup>。

*xanA* 和 *xanB* 是 35.3kb 基因簇内的两个基因,

它们的编码产物由于与多糖合成的前体糖核苷衍生物的形成有关,因此同时参与 EPS 和 LPS 的合成<sup>[4,5]</sup>。近年的研究表明,35.3kb 基因簇内的大多数基因参与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的合成与分泌,*wxcA* 基因是该基因簇内的一个基因,首先从 *Xcc* B100 菌株中克隆到,该基因参与 B100 菌株细胞 LPS 的合成但与 EPS 的合成无关<sup>[7]</sup>。但在以前的工作中,我们获得一批 EPS 合成减少的突变体<sup>[8]</sup>,对这些突变体的 Tn5<sub>gusA5</sub> 的插入位点进行分析后,发现有两株编号为 021C12 和 048H1 的突变体是 *wxcA* 基因的 Tn5<sub>gusA5</sub> 不同插入位点的突变体。为明确 *Xcc* 8004 菌株 *wxcA* 基因的功能,本工作对 8004 菌株 *wxcA* 基因进行缺失和互补分析,发现 8004 菌株 *wxcA* 基因的敲除除了导致细胞 LPS 合成受影响外,还使得细胞 EPS 产量降低约 50%,并且一段包含有 *wxcA* 基因的 PCR 产物能反式互补 *wxcA* 基因缺失突变体,恢复突变体细胞的 EPS 产量。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及质粒

8004 菌株为 *Xcc* 野生型菌株、021C12 和 048H1 为 8004 菌株 *wxcA* 基因的 Tn5<sub>gusA5</sub> 插入(*wxcA*::

收稿日期 2003-12-13, 修回日期 2004-03-29。

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目( NO.30130010 )。

\* 通讯作者。 Tel 86-771-3233650 ; Fax 86-771-3237873 ; E-mail ljug2002@sina.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Tn5 *gusA5* 突变体、8570 为 8004 菌株 *wxcA* 基因缺失 ( $\Delta wxcA$ ) 突变体, JM109 为大肠杆菌 (*E. coli*)。 *Xcc* 和 *E. coli* 的培养条件和抗生素的用法用量参考文献<sup>[9]</sup>。广谱宿主质粒 pLAFR3 以及 pLAFR3 的不相容质粒 pPH1JI 分别参考文献[10]和[11], 质粒 pGET943 参考文献[8], 该质粒是由载体 pGEM-3Zf(+ ) 的 *Kpn* I / *Xba* I 酶切位点处克隆上一段 PCR 合成的 939bp 的卡那霉素(Km)抗性基因 *kan* 而产生的。

## 1.2 DNA 操作

质粒 DNA 的碱裂解法提取参考文献[12], 细菌总 DNA 的快速提取参考文献[13], 限制酶酶切、DNA 的连接转化、Southern 杂交按 Sambrook 方法<sup>[14]</sup> 或厂家提供的方法进行。限制酶, T4 连接酶, *pfu* 聚合酶, DNA 同位素标记试剂盒等购自 Promega 公司, 其它生化试剂购自上海生工生物工程公司。

## 1.3 *wxcA* 基因的 PCR 扩增

根据 8004 菌株 *wxcA* 基因的上游和下游序列设计引物 P1、P2 (P1: ACAGTTGAATTCCGA AAAGACCGAACTGTT, P2: ACAGTTAAGCTTAGGAACACGGTATGGCAG, P1、P2 分别加上 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 下划线所标, 下划线前为保护碱基, 以下引物表示方式相同), 扩增 8004 基因组中长度为 1624bp 的片段, 该片段包含 *wxcA* 基因及其上游约 200bp 的片段。以 8004 总 DNA 为模板, P1、P2 为引物, 在 95℃ 预变性 4 min、95℃ 变性 1 min、60℃ 复性 30 s、74℃ 延伸 2 min、30 个循环、74℃ 延伸 5 min 的反应条件进行 PCR 反应, 扩增得到的约 1.6kb DNA 片段经测序证实符合设计要求后, 将该片段以 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切后, 连接到 pLAFR3, 得到重组质粒 pLATC8570, pLATC8570 通过电脉冲转化到 *E. coli* JM109 的细胞内。

## 1.4 $\Delta wxcA$ 突变体的构建

根据 *wxcA* 基因上游序列设计引物 U1、U2 (U1: ACAGTTGAATTCTGCTGCTGCTGGACAACA, U2: ACAGTTGCTACCCTGACGTTGCCAAGAATC, U1、U2 分别加上 *Eco*R I 和 *Kpn* I 酶切位点序列), 下游序列设计引物 D1、D2 (D1: ACAGTTCTAGAGACGTCGTTTGAAGC, D2: ACAGTTGTCGACGATACAAAACCCAGGATG, D1、D2 分别加上 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切位点序列), 分别扩增 *wxcA* 基因上游 679bp 和下游 903bp 的同源片段, PCR 扩增条件同 1.3。扩增得到的上下游同源片段经测序验证后依次连接到 pGET943 的 *kan* 基因上游和下游位置, 得到一个

*wxcA* 基因被 *kan* 基因所替换的重组质粒 pGET8570, 重组质粒 pGET8570 经 *Eco*R I 酶切线性化后, 连接到质粒 pLAFR3, 得到重组质粒 pLAT8570。将 pLAT8570 通过三亲本接合导入野生型菌株 8004 的细胞内, 然后利用二亲本接合, 将 pLAFR3 的不相容质粒 pPH1JI 导入接合子, 筛选同源双交换所产生的 *wxcA* 基因缺失突变体, 将获得的突变体命名为 *Xcc* 8570。三亲本接合、二亲本接合的具体过程参考文献[9]。  $\Delta wxcA$  突变体采用 PCR 和 Southern 杂交证实。PCR 扩增以 P1、P2 为引物, 分别以 8004 和 8570 的 1~4 号菌株的总 DNA 为模板, 反应条件同 1.3。Southern 杂交则分别以 *kan* 基因和 *wxcA* 基因为探针, 分别对经 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切的 8004 和 8570 的 1~4 号菌株的总 DNA 进行杂交。

PCR 引物由上海生工合成, PCR 产物由华舜公司的 DNA 纯化试剂盒纯化。

## 1.5 胞外多糖和脂多糖的检测

对 EPS 产量作定性分析是将 *Xcc* 接种到 10mL 的 NYGB 28℃ 摇床培养过夜后, 对培养物浓度进行调节以使 OD 值基本相同, 用移液器精确取 1 $\mu$ L 的培养物, 分别接种于含 2% 葡萄糖的 NYGA 平板, 将平板置于 28℃ 培养箱培养 3 d 后在自然光照下培养 2 d, 再通过比较菌落的形态大小, 对 EPS 的产量作定性比较。对 EPS 产量作定量分析是将 *Xcc* 的过夜培养物以 1% 的接种量接种至加 2% 葡萄糖的 200mL NYGB 培养基 28℃ 摇床培养 3 d, 取适量的培养物离心弃掉菌体, 将上清液缓慢注入到 5 倍的无水乙醇, 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 mL 培养液含多少 mg EPS 进行菌株间的产量比较。

脂多糖的检测具体方法参考文献[15], 采用全细胞裂解法提取 LPS 后以 SDS-PAGE 凝胶电泳和银染法对 LPS 进行分析。

## 1.6 DNA 和蛋白质序列分析

使用的数据库为 *Xcc* 8004 菌株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>), 分析软件为 BLAST 和 NTI vector。蛋白质分子量和等电点的预测在 <http://www.expasy.org/cgi-bin/prot-param> 进行, 蛋白质功能域分析在 <http://smart.embl-heidelberg.de> 进行。

## 1.7 *wxcA* 基因序列

本文的 *Xcc* 8004 菌株的 *wxcA* 基因序列已提交

至 GenBank , 基因库接受号 ( Accession No. ) 为 AY497774。

## 2 结果与分析

### 2.1 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体的分离

在以前的工作中获得一批 8004 菌株的 EPS 合成减少 ( EPS<sup>-</sup> ) 的 Tn5*gusA5* 突变体 , 对突变体的 Tn5*gusA5* 在基因组的插入位点进行分析<sup>[8]</sup> , 发现编号为 021C12 和 048H1 的两株突变体均是 *wxcA* 基因的 Tn5*gusA5* 突变体 , *wxcA* 基因参与脂多糖 O-抗原的合成 , ORF 全长 1383bp , 021C12 和 048H1 的 Tn5*gusA5* 分别插在 ORF 起始密码子下游第 344bp 和第 1054bp 的位置 , 因此 EPS-突变体 021C12 和 048H1 是 *wxcA* 基因的 Tn5*gusA5* 不同插入位点的突变体。

### 2.2 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体的互补

由于两株不同插入位点的 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体的 EPS 合成均减少 , 表明 *wxcA* 基因可能与 EPS 合成产量有关。为证实 *wxcA* 基因与 EPS 合成产量是否有关 , 通过 PCR 方法合成完整的 *wxcA* 基因 , 并用 *wxcA* 基因反式互补 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体 021C12 , 检测突变体的 EPS 合成是否恢复。

根据 8004 菌株 *wxcA* 基因上游和下游序列设计引物 P1、P2 , 扩增完整的 *wxcA* 基因 ( 产物电泳图见图 1 ) , 将 PCR 扩增得约 1.6kb 的 DNA 片段经测序证实符合设计要求后 , 克隆到质粒 pLAFR3 , 得到的重组质粒 pLATC8570 ( 酶切鉴定见图 2 ) , 然后将 pLATC8570 通过三亲本接合导入 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体 021C12 的细胞 , 得到 20 株接合子 021C12/pLATC8570。经提质粒证实 , 这 20 株接合子均携带有重组质粒 pLATC8570。作为对照 , 同时将 pLAFR3 导入 8004 和 021C12 , 得到 15 株 8004/pLAFR3 和 18 株 021C12/pLAFR3 接合子。将 021C12/pLATC8570、8004/pLAFR3 和 021C12/pLAFR3 分别接种在加 2% 葡萄糖的 NYGA 平板 , 培养 5 d 后 , 8004/pLAFR3 所形成的菌落较大较粘稠 , 而 021C12/pLATC8570 形成的菌落大小形态与 021C12/pLAFR3 形成的菌落基本一致 , 比 8004/pLAFR3 形成的菌落小。这表明 *wxcA* 基因不能互补 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体 021C12 , 恢复突变体 EPS 的产量。

### 2.3 $\Delta wxcA$ 突变体的构建

转座子 Tn5*gusA5* 对染色体的诱变是极性突变 , 除破坏插入位点的基因外 , 还阻断与插入位点基因同一操纵子的下游基因的转录。因此 , *wxcA* 基因不能互补 *wxcA*::Tn5*gusA5* 突变体 021C12 , 并不能排除

*wxcA* 基因与 EPS 合成无关。为明确 *wxcA* 基因的功能对 8004 菌株的 *wxcA* 基因进行缺失 , 构建 8004 菌株的  $\Delta wxcA$  基因突变体。

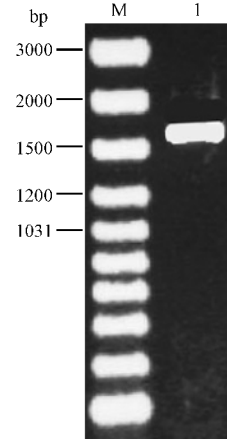


图 1 *wxcA* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of the gene *wxcA*

PCR reactions were performed with total DNA of wild-type strain 8004 as template , P1 and P2 as primers , and 30 cycles of denaturation at 95°C for 60 s , annealing at 60°C for 30 s , extension at 74°C for 2 min .

PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel .

M :100bp DNA ladder ; 1 : PCR products

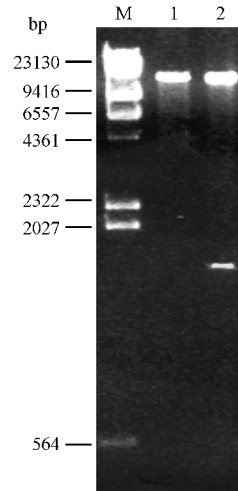


图 2 重组质粒 pLATC8570 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of the recombinant plasmid pLATC8570

Plasmid DNAs were digested with *Bam*H I and *Hind*III , and the reaction mixture were electrophoresed in 1.0% agarose gel . The released 1.6kb fragment from pLATC8570 contained the complete sequence of *wxcA* gene .

M  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker ; 1 : pLAFR3 ; 2 : pLATC8570

采用基因置换策略 , 以卡那霉素抗性基因 *kan* 置换 8004 菌株染色体的 *wxcA* 基因。根据设计 , 染色体上 *wxcA* 基因的 1200bp 区域将被 939bp 的 *kan* 基因片段所置换 , 得到的  $\Delta wxcA$  突变体命名为 Xcc 8570 , 然后采用 PCR 和 Southern 杂交对  $\Delta wxcA$  突变体进行验证。

证。PCR 验证是分别以 8004 和 8570 的 1~4 号菌株的总 DNA 为模板,以 P1、P2 为引物进行。PCR 反应结果见图 3,从 8004 扩增得到的产物大小约 1.6kb,而从 8570 的 1~4 号菌株扩增得到的产物大小约 1.4kb,比从 8004 扩增得到的产物约小 200bp,表明这 4 株突变体是由 *wxcA* 基因被 *kan* 基因置换所产生。Southern 杂交验证是以 PCR 扩增得到的 *wxcA* 基因和 *kan* 基因的 DNA 片段作探针,分别对 8004 和 8570 1~4 号菌株的总 DNA 进行杂交。杂交结果见图 4,8004 在约 6kb 处具有一条杂交带,4 株突变体在相应位置则没有出现杂交带,而在约 3kb 处出现两条杂交带,这是由于 *kan* 基因具有一个 *Hind*III 酶切位点,*wxcA* 基因被 *kan* 基因置换后,6kb 的 *Bam*H I/*Hind*III 变成 2 条约 3kb 的片段,这进一步证实 8570 的 1~4 号菌株的 *wxcA* 基因已被 *kan* 基因置换。在以下工作中,取 8570 的 1 号菌株进行试验。

对  $\Delta wxcA$  突变体的反式互补是将重组质粒 pLATC8570 通过三亲本接合导入 8570 细胞内,得到接合子 8570/pLATC8570 25 株,作为对照,同时将 pLAFR3 导入 8004 和 8570 的细胞。

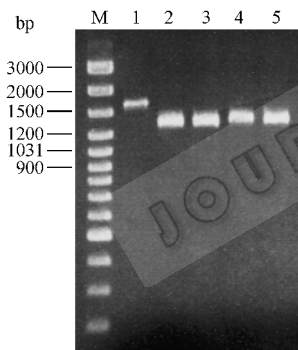


图 3  $\Delta wxcA$  突变体的 PCR 验证

Fig.3 PCR identification of  $\Delta wxcA$  mutants

PCR reactions were performed with total DNA of wild-type strain 8004 and 4 isolates of  $\Delta wxcA$  mutant 8570 as template respectively, P1 and P2 as primers, and 30 cycles of denaturation at 95°C for 60 s, annealing at 60°C for 30 s, extension at 74°C for 2 min. PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel. M: 100bp DNA ladder; 1: 8004; 2~5: four independent isolates of  $\Delta wxcA$  gene mutant 8570

## 2.4 *wxcA* 基因不影响细胞的生长繁殖

为了解 *wxcA* 基因功能的丧失,是否影响细胞的生长繁殖,对  $\Delta wxcA$  突变体 8570 的生长繁殖进行测定。以 8004 作对照,绘制生长曲线(图 5)。突变体 8570 的生长曲线与野生型菌株 8004 基本相同,8570 在 NYGB 培养基的生长繁殖速度与 8004 相比,基本没有差异,这两株菌株的代时均约为 1.62 h。这表

明 *wxcA* 基因功能的丧失并没有影响细胞在 NYGB 培养基的正常生长繁殖。

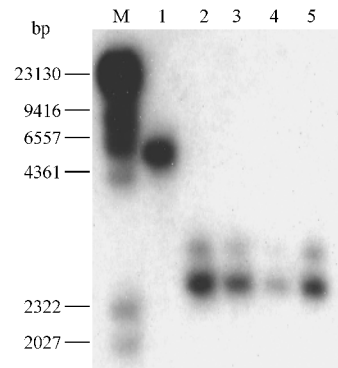


图 4  $\Delta wxcA$  突变体的 Southern blot 分析

Fig.4 Southern blot analysis of  $\Delta wxcA$  mutants  
Total DNA of wild-type strain 8004 and 4 isolates of  $\Delta wxcA$  mutant 8570 were digested with *Bam*H I/*Hind*III and electrophoresed in 1.0% agarose gel. DNAs were transferred to Nylon membrane, and hybridized with  $^{32}$ P-labeled *kan* gene and *wxcA* gene probes.  
M:  $\lambda$ DNA/*Hind*III Marker; 1: 8004;  
2~5: four independent isolates of  $\Delta wxcA$  mutant 8570

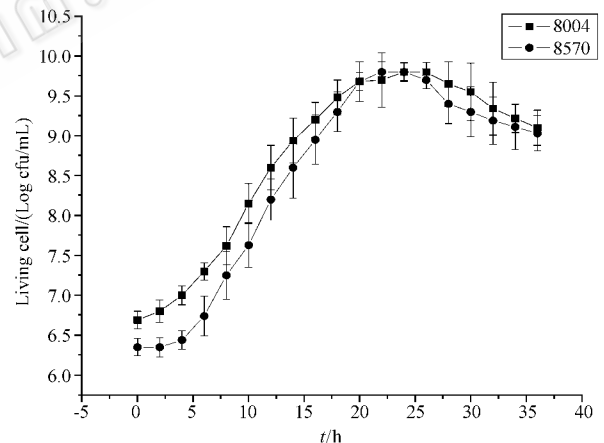


图 5  $\Delta wxcA$  突变体 8570 在培养基 NYGB 的生长曲线

Fig.5 The growth curve of the  $\Delta wxcA$  mutant in rich medium NYGB

## 2.5 *wxcA* 基因与 EPS 产量有关

将 8570/pLATC8570、8004/pLAFR3、8570/pLAFR3 三种菌株接种在含 2% 葡萄糖的 NYGA 培养基的平板上,定性比较 EPS 产量。将平板在 28°C 培养箱培养 3 d 后再见光培养 2 d,观察比较菌落大小形态(图 6)。8570/pLAFR3 形成的菌落大小形态与 8004/pLAFR3 和 8570/pLATC8570 相比,菌落较小,并且随着培养时间的延长,圆形菌落往往变得不规则,而 8570/pLATC8570 和 8004/pLAF3 这两种菌株形成的菌落大小形态基本一样,较大较粘稠。这表明

$\Delta wxcA$  突变体与野生型菌株相比, EPS 产量降低, 并且 *wxcA* 基因能反式互补该突变体, 恢复 EPS 的产量。

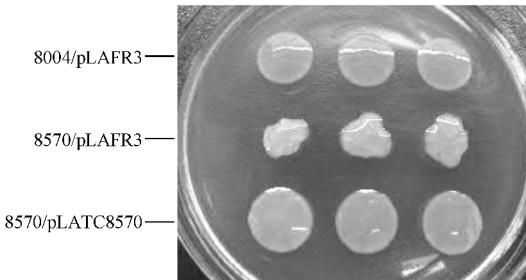


图 6  $\Delta wxcA$  突变体的 EPS 检测

Fig.6 Examination of EPS yield of  $\Delta wxcA$  mutant

平板检测表明  $\Delta wxcA$  突变体 EPS 产量比野生型菌株 8004 降低, 为了解  $\Delta wxcA$  突变体 EPS 减少的程度, 采用液体培养基培养菌体后, 用乙醇沉淀法提取 EPS, 定量检测  $\Delta wxcA$  突变体 EPS 的产量。将 8570、8570/pLATC8570、8004/pLAFR3、8570/pLAFR3 等 4 株菌株分别从 NYGA 平板接种到 10mL 的 NYGB 液体培养基后过夜培养, 再将过夜培养物以 1% 的接种量分别接种至加有 2% 葡萄糖和不加葡萄糖的 NYGB 培养基中, 28℃ 摇床培养 3 d, 分别测定这 4 株菌株的胞外多糖, 结果见表 1。菌株在 NYGB 培养基培养 3 d 后, 8570 和 8570/pLAFR3 的培养液中 EPS 含量约为 1.3 mg/mL, 而 8004/pLAFR3 培养液的 EPS 含量与 8570/pLATC8570 差别不大, 约为 2.0 mg/mL。菌株在加 2% 葡萄糖的培养基培养时, EPS 含量较高, 8570 和 8570/pLAFR3 的培养液中 EPS 含量约为 3.3 mg/mL, 而 8004/pLAFR3 和 8570/pLATC8570 则约达到 6.9 mg/mL,  $\Delta wxcA$  突变体 EPS 产量与野生型菌株相比, 降低 50% 左右。

表 1  $\Delta wxcA$  突变体的 EPS 产量  
Table 1 EPS yield of  $\Delta wxcA$  mutant

Strain	EPS yield( mg/mL )	
	NYGB medium	NYGB medium + 2% glucose
8570	1.30 ± 0.71	3.48 ± 0.72
8570/pLAFR3	1.38 ± 0.52	3.23 ± 0.53
8570/pLATC8570	2.15 ± 0.12	6.90 ± 0.85
8004/pLAFR3	2.03 ± 0.07	6.97 ± 0.77

\* ± Standard error

## 2.6 *wxcA* 基因与 LPS 合成有关

以上结果证实 8004 菌株的 *wxcA* 基因与 EPS 的产量有关, 为证实该基因也参与 8004 菌株的 LPS 合成, 分别提取 8570、8570/pLATC8570 和 8004 三种菌株的 LPS, 以 SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 电泳图见图 7 结果表明 8570 的 LPS 电泳图谱与 8004 相比, 发

生了变化, 而 8570/pLATC8570 和 8004 的电泳图谱基本一致, 这证实 8004 菌株的 *wxcA* 基因参与 LPS 的合成。

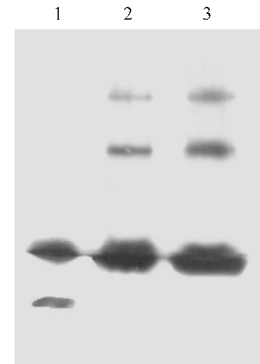


图 7 LPS 电泳分析图

Fig.7 SDS-PAGE gel electrophoresis of LPS

1 8570 2 8004 3 8570/pLATC8570

## 2.7 *wxcA* 基因的基本特征

8004 菌株的 *wxcA* 基因 ORF 全长 1383bp, 利用 blastn 程序将该基因与 GenBank 的 database 的 DNA 序列作同源比较发现, 8004 菌株的 *wxcA* 基因与 *Xcc* ATCC33913 菌株和 *Xcc* B100 菌株的 *wxcA* 基因(GI: 21111598, 14090407) 分别具有 100% 和 99% 的一致性。*wxcA* 基因首先从 B100 菌株中克隆到, 功能研究发现该基因参与 B100 菌株 LPS 的 O-抗原合成, 但并不影响 EPS 的合成<sup>[7]</sup>; ATCC33913 是 *Xcc* 的另一菌株, 于近年已完成了全基因组测序, 但对其 *wxcA* 基因功能的研究未见报道, 只是根据 B100 菌株 *wxcA* 基因研究结果进行注释<sup>[16]</sup>。根据 8004 菌株 *wxcA* 基因序列推测其编码产物是一个 461 个氨基酸残基组成的蛋白质, 该蛋白质的预测分子量为 51.5kD, 等电点为 8.32。对该产物进行同源比较发现, 该蛋白与新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*) 的 LPS 合成相关基因 *lpsE* 和大肠杆菌 O9(*E. coli* O9) 的 LPS 合成相关基因 ORF704 演绎的编码产物均有 44% 的相似性<sup>[17, 18]</sup>。对该产物的功能域进行分析, 发现该蛋白质具有第 1 家族糖基转移酶的功能域, 位于第 241 ~ 436 个氨基酸残基组成的区域。这表明 *wxcA* 基因可能编码一个第 1 家族糖基转移酶。

## 3 讨论

Vorholter 等从 *Xcc* B100 菌株克隆和鉴定了一簇共 15 个与 LPS 合成有关的基因, *wxcA* 基因是该簇基因中的一个, Vorholter 等对 B100 菌株的两株 *wxcA* 基因 Tn5-B20 不同插入位点的突变体的表型进行分

析,发现这两株突变体的 LPS 电泳图谱与野生型菌株相比,发生了变化,因此认为 *wxcA* 基因参与 LPS 合成,但由于这两株突变体所形成的菌落大小形态与野生型菌株 B100 相比,基本没有差异,因此认为该基因与 EPS 的合成无关<sup>[15]</sup>。而在本课题组所分离到的 EPS 合成减少的突变体中,发现两株突变体是 *wxcA* 基因的 Tn5 *gusA5* 插入突变体,这两株突变体在含 2% 葡萄糖的 NYGA 平板上形成的菌落大小形态与野生型菌株 8004 相比,较小且不规则,对 8004 菌株的 *wxcA* 基因进行缺失和功能互补分析,证实 *wxcA* 基因与 8004 菌株的 EPS 的合成产量有关。这表明 8004 菌株的 *wxcA* 基因除了与细胞的 LPS 合成有关外,还与 EPS 的合成产量有关。

对 *wxcA* 基因的序列分析发现,该基因编码产物具有第 1 家族糖基转移酶的功能域,表明该基因可能编码一个糖基转移酶。第 1 家族糖基转移酶的功能是将糖基转移至各种不同的底物如肝糖元、6-磷酸果糖、脂多糖等,参与细菌的胞外多糖、脂多糖核心区、粘液多糖等细胞表面多糖的合成。在本工作中发现 8004 菌株的 *wxcA* 基因与 EPS 的合成产量有关,这可能是 *wxcA* 基因失活后,直接影响 EPS 合成过程中某一糖基转移的反应,从而影响 EPS 的合成产量,也可能是 *wxcA* 基因失活后,LPS 的合成受影响,使得细胞的膜蛋白和分泌系统蛋白的正确组装或者细胞的信号转导等受影响,从而影响 EPS 的转运和分泌。因此,8004 菌株的 *wxcA* 基因在 EPS 合成过程中的具体作用方式,以及为何 *wxcA* 基因在不同菌株间引起不同的表型变化等问题有待进一步研究。

两株 *wxcA*::Tn5 *gusA5* 突变体的 EPS 合成均减少,但一段包含完整的 *wxcA* 基因的 DNA 片段却不能互补 *wxcA*::Tn5 *gusA5* 突变体 021C12,恢复突变体 EPS 的产量,这是由于转座子 Tn5 *gusA5* 对细胞的诱变是极性突变,Tn5 *gusA5* 插入细胞的染色体后,除破坏插入位点基因外,还阻断与该基因同一操纵子的下游基因的表达。因此,Tn5 *gusA5* 插入 *wxcA* 基因,不但破坏了 *wxcA* 基因,使 *wxcA* 基因不能转录,而且还阻断了与 *wxcA* 基因同一操纵子的下游基因如 *wxcB*、*wxcC*、*wxcD* 等基因的转录,因此单个 *wxcA* 基因不能恢复 *wxcA*::Tn5 *gusA5* 突变体的 EPS 产量,这表明在与 *wxcA* 基因同一操纵子的下游基因中还有一些基因与 EPS 的合成产量有关。但至于在 *wxcA* 基因的下游还有哪些基因与 EPS 的合成有关,我们将另文发表。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Kennedy JF, Bradshaw IJ. Production, properties and application of xanthan. *Prog Ind Microbiol*, 1984, **19**: 319 - 371
- [ 2 ] Capage MR, Doherty DH, Betlach MR *et al.* Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum. March 1987, International patent WO87/05938.
- [ 3 ] Harding NE, Cleary JM, Cabanas DK *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
- [ 4 ] Köplin 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
- [ 5 ] Harding NE, 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
- [ 6 ] Harding NE, Cleary JM, 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.
- [ 7 ] Vorholter FJ, 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
- [ 8 ] LU GT(陆光涛), TANG JL(唐纪良), HE YQ(何勇强) *et al.* Identification and cloning of a novel gene involved in EPS biosynthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2003, **19**(6): 661 - 667
- [ 9 ] Turner P, Barber C, Danniels M. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Gen Genet*, 1984, **195**: 101 - 107
- [ 10 ] Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N *et al.* Molecular characterization of cloned avirulence genes from race0 and race1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 5789 - 5794
- [ 11 ] Beringer JE, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV *et al.* Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature*, 1978, **276**: 633 - 634
- [ 12 ] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979, **7**: 1513 - 1523
- [ 13 ] Chen WP, Kuo TT. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**: 2260
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 15 ] Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol*, 1983, **154**: 269 - 277
- [ 16 ] da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC *et al.* Comparison of the ge-

*Nature* 2002 **417** : 459 – 463

- [ 17 ] Awram P , Smit J. Identification of lipopolysaccharide O antigen synthesis genes required for attachment of the S-layer of *Caulobacter crescentus* . *Microbiology* 2001 **147** : 1451 – 1460

- [ 18 ] Sugiyama T , Kido N , Yokochi T *et al.* . Generation of *Escherichia coli* O9a serotype , a subtype of *E. coli* O9 , by transfer of the *wb* \* gene cluster of *Klebsiella* O3 into *E. coli* via recombination . *J Bacteriol* , 1998 **180** 2775 – 2778

## The Gene *wxcA* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004 Strain Involved in EPS Yield

LU Guang-Tao TANG Ji-Liang\* WEI Guang-Ning HE Yong-Qiang CHEN Bao-Shan  
( *Institute of Molecular genetics , Guangxi University , Nanning 530005 , China* )

**Abstract** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*( *Xcc* ) the pathogenic agent of black rot disease in cruciferous plants , produces large amount of extracellular polysaccharide( EPS ) , which has found wide applications in industry. For the great commercial value of the xanthan gum , many of the genes involved in EPS biosynthesis have been cloned and the mechanism of EPS biosynthesis also has been studied. 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 in our previous work. The Tn5 *gusA5* inserted sites of these mutants were located by using thermal asymmetric interlaced PCR , and results showed that two EPS-defective mutants were insertion mutants of the gene *wxcA* which involved in lipopolysaccharide( LPS ) biosynthesis. The gene *wxcA* involved in lipopolysaccharide biosynthesis but dose not extracellular polysaccharide in others ' report. *wxcA*::Tn5 *gusA5* mutant 021C12 , the polar mutant , was complemented with recombinant plasmid pLATC8570 harboring an intact *wxcA* gene in this work , but the yield of EPS of the *wxcA*::Tn5 *gusA5* mutant was not restored. In order to identify the function of *wxcA* gene of *Xcc* 8004 strain , the gene *wxcA* was deleted by gene replacement strategy , and the no-polar mutant of *wxcA* was obtained.  $\Delta wxcA$  mutant strain , named *Xcc* 8570 , was confirmed by using both PCR and southern analysis. Beside the LPS biosynthesis of  $\Delta wxcA$  mutant was affected , The EPS yield of  $\Delta wxcA$  mutant strain reduced by 50% as compared with the wild-type strain 8004.  $\Delta wxcA$  mutant could be complemented in trans with the intact *wxcA* gene , and the EPS yield of the mutant was restored. The combined data showed that *wxcA* gene not only involved in LPS biosynthesis but also EPS yield in *Xcc* 8004 strain.

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

Received : 12-13-2003

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 ;E-mail :lug2002@sina.com