

• 农业生物技术 •

MarR 家族转录因子 HpaR 和 XC0449 协同调控野油菜黄单胞菌致病性

李雅君^{1,2}, 李爱宁¹, 孟繁凡², 张宏宇², 钱韦², 贺伟¹, 邓超颖²

1 北京林业大学 林学院, 北京 100083

2 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

李雅君, 李爱宁, 孟繁凡, 等. MarR 家族转录因子 HpaR 和 XC0449 协同调控野油菜黄单胞菌致病性. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1500–1510.

Li YJ, Li AN, Meng FF, et al. MarR family transcription regulator HpaR and XC0449 coordinately regulate the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1500–1510.

摘 要: MarR 家族转录因子广泛存在于细菌及古生菌中, 并灵活、精细地调控多种毒力、抗胁迫及抗生素相关的生理生化途径。在野油菜黄单胞菌中, MarR 家族转录因子 HpaR (XC2827) 的失活会显著降低细菌对于寄主甘蓝的致病力, 同时会导致胞外蛋白酶的过表达。本研究进一步发现, Xcc 8004 基因组一共编码 9 个 MarR 家族转录因子。表达并纯化其中的 HpaR (XC2827) 和 XC0449, 体外微量热泳动 (MST) 实验及 Pull-down 实验证明二者可以在体外特异性结合。同时, 表型检测发现 XC0449 突变会导致细菌致病力显著下降。通过体外凝胶迁移阻滞试验 (EMSA)、体内 qRT-PCR 和 GUS 检测证明, XC0449 和 HpaR 均作为转录激活子协同调控下游致病相关基因 XC0705 的表达, 最终调控细菌毒力及胞外酶合成。

关键词: 转录调控, MarR 家族转录因子, 野油菜黄单胞菌, 致病性

MarR family transcription regulator HpaR and XC0449 coordinately regulate the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Yajun Li^{1,2}, Aining Li¹, Fanfan Meng², Hongyu Zhang², Wei Qian², Wei He¹, and Chaoying Deng²

1 The College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: MarR family transcription regulators are ubiquitous among bacteria and archaea. They extensively control

Received: January 31, 2019; **Accepted:** February 28, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31600062, 31400545, 31370127).

Corresponding authors: Chaoying Deng. Tel: +86-10-64806152; E-mail: dengcy@im.ac.cn

Wei He. Tel: +86-10-62338127; E-mail: hewei@bjfu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31600062, 31400545, 31370127) 资助。

multiple cellular processes and elaborately regulate the expression of genes involved in virulence, stress response and antibiotics at translational level. In *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, insertional inactivation of MarR family transcription regulator HpaR (XC2827) resulted in significantly decrease in virulence and increase in the production of the extracellular proteases. Here, we reported that the genome of *Xcc* 8004 encodes nine MarR family transcription regulators. The MarR family transcription regulators, HpaR (XC2827) and XC0449, were heterologous expressed and purified. *In vitro* MST and Pull-down assay confirmed the physical interaction between HpaR and XC0449. Phenotypical assay determined that deletion of *XC0449* resulted in substantial virulence attenuation. *In vitro* EMSA, *in vivo* qRT-PCR and GUS activity assay identified that HpaR and XC0449 coordinately act as the transcriptional activator to regulate the expression of the virulence-associated gene *XC0705*, and eventually control the bacterial virulence and the production of extracellular proteases.

Keywords: transcription regulation, MarR family transcriptional factor, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, virulence

MarR (Multiple antibiotic resistance regulator) 家族转录因子作为控制多重抗生素抗性的一种转录抑制子, 于 1983 年首次在大肠杆菌中被鉴定^[1-2], 这些抗生素包括四环素、氯霉素、嘌呤霉素、萘啶酸、青霉素、氟喹诺酮等^[3-4]。MarR 家族转录因子广泛存在于细菌及古生菌中^[5]。根据 Pfam 数据库的统计, 结合已有的遗传及生化证据, 目前在 44 000 种细菌和古生菌中分布着至少 335 000 个 MarR 家族转录因子^[6-7]。结构上, MarR 家族转录因子是保守的有翼的螺旋-转角-螺旋 (wHTH) 结合蛋白, 以二聚体的形式结合在启动子内的回文序列上^[8]。功能上, 它们作为感应环境变化的传感器, 能够结合小分子化合物并快速启动转录水平的适应性调节^[9], 包括控制毒力因子产生、对抗生素和氧化应激的反应以及环境芳香族化合物的分解代谢等。MarR 作为转录调控因子, 既可以抑制也可以激活下游基因的表达。在特定的信号或者配体分子存在的情况下, MarR 蛋白与 DNA 的结合被改变, 从而控制不同基因的表达^[10]。

野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*) 是一种杆状、极生单鞭毛、营化能异养型革兰氏阴性细菌, 是十字花科植物的主要病原菌, 也是植物病理学研究领域的主要模式生物。它能够侵染模式植物拟南芥以及包括甘蓝、白菜、花椰菜、芥菜、萝卜、油菜等多种重要十字花科作物并引起黑腐病, 每年造成巨大的经济损失^[11-12]。目前, 已有 3 个 *Xcc* 菌株完成

了全基因组序列测定, 它们的全基因组大小约 5.1 Mb, 编码 4 000 余个基因^[13-14]。功能基因组学分析结合遗传学证据发现, *Xcc* 中至少有 100 个基因参与了细菌的致病过程, 涉及胞外多糖合成、胞外酶合成、各类分泌系统相关蛋白、铁锌离子转运、细胞解毒途径、纤毛和菌毛组装以及芳香族氨基酸等大分子合成等多种生理生化途径, 并受到精细、灵活及严格的转录水平的调控^[15-16]。

已有研究表明, MarR 家族转录因子 HpaR (XC2827) 的失活会显著降低细菌对于寄主甘蓝的致病力和非寄主辣椒的超敏反应, 同时会导致胞外蛋白酶的过量表达^[17]。此外, HpaR 能作为转录激活子或抑制子直接调控约 448 个下游基因的表达, 涉及细菌毒力及相关的多种生理生化过程^[18]。本研究进一步发现, *Xcc* 8004 基因组共编码 9 个 MarR 家族转录因子, 其中 *XC0449* 基因编码的转录因子能与 HpaR 相互作用, 并协同调控下游致病相关基因 *XC0705* 的表达, 最终调控细菌毒力及胞外蛋白酶合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、BL21 (DE3) 购自 Invitrogen 公司, TB1 购自 BioLabs 公司。野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004, *Xcc*) 为中国科学院微生物研究

所植物基因组学国家重点实验室保存。

1.1.2 质粒载体

克隆载体 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司。敲除载体 pK18mob 和 pK18mobSacB, 广寄主互补载体 pHMI、pHMII 均为中国科学院微生物研究所植物基因组学国家重点实验室保存。表达载体 pET30a 购自 Novagen 公司。pMAL-p2X 购自 BioLabs 公司。实验中所用引物见表 1。

1.1.3 常用分子生物学试剂

各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 和 Promega 公司。各种 *Taq* 酶购自 Qiagen 公司。其他常用分子生物学及生化试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分子生物学基本操作

PCR 扩增、酶切、连接、转化大肠杆菌感受态细胞等常规分子生物学基本操作均按 Molecular Cloning^[19]进行。

1.2.2 细菌的培养条件

LB 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L) 用于培养大肠杆菌, 培养温度为 37 °C; NYG 培养基 (蛋白胨 5 g/L, 酵母提取物

3 g/L, 甘油 20 g/L) 用于培养野油菜黄单胞菌 (*X. campestris* pv. *campestris* 8004, *Xcc*), 培养温度为 28 °C; 在特定的诱导条件下需要用到 MMX 培养基 (葡萄糖 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, 柠檬酸三钠 1 g/L, K₂HPO₄ 4 g/L, KH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L) 以及 XVM2 培养基 (NaCl 1.2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.32 g/L, MgSO₄ 1.23 g/L, CaCl₂ 0.11 g/L, K₂HPO₄ 0.022 g/L, KH₂PO₄ 0.073 g/L, FeSO₄ 0.003 g/L, 果糖 1.8 g/L, 蔗糖 3.43 g/L)。抗生素的配制浓度为利福平 (Rifampicin, 25 µg/mL), 卡那霉素 (Kanamycin, 50 µg/mL) 和壮观霉素 (Spectinomycin, 150 µg/mL)。

1.2.3 读框内删除突变体以及双突变株的构建

按照内删除引物设计原则设计引物, 具体引物设计见表 1。分别扩增两条片段, 酶切连接到 pK18mobSacB 质粒上, 测序酶切正确后, 电击到野油菜黄单胞菌野生型感受态中, 进行二次交换后, 通过扩增片段大小判断菌株是否正确。

双突变株的构建即用成功构建的单突变体菌株制备感受态, 将 pK18mobSacB 上构建的另一基因重组载体转化到单突变体感受态中, 进行二次交换, 并筛选出正确的双突变体菌株。

表 1 本研究中所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (forward/reverse, 5'-3')
ΔXC0449-A	TCTAGACATCTTGCGGAAGTAGTCGTG
ΔXC0449-B	CATATGCACGCTGAGGCGATAGGG
ΔXC0449-C	CATATGAGCGCCGAAGAACAGCAGAC
ΔXC0449-D	AAGCTTCGGAAGCGACGCAGTG
XC0449-F	CATATGATGAGCGATCTCGACACCCC
XC0449-R	AAGCTTGTCCTTGCTGGCCATCCG
tmRNA-F	CCAACGACGACAACACTACGGT
tmRNA-R	ACGAGCACGGGCACAAG
qRT-0705-F	TCAATGCGGCGTACTTCC
qRT-0705-R	TCGCCGCCCATCACAT
P0705-F	GCCAAGTAACGCCACGCAC
P0705-R	GACGTAGTCACCCGAAGAAGAAGA
GUS-0705-F	GAATTCTCGTTTCCTTGCCAAGTAACG
GUS-0705-R	GGATCCCCCGAAGAAGAAGAGACGCG

1.2.4 植物致病力、胞外酶表型分析

野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 对于寄主 (*Brassica oleracea* cv. Jingfeng 1) 的致病力通过剪叶法来进行观测^[20]。

胞外酶检测:将菌液摇至 $OD_{600}=0.4$, 取 1.5 μL 于含有 0.1% 可溶性淀粉的 NYG 平板上, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 。培养 48 h 后用 1:100 I_2/KI (0.08 mol/L I_2 , 3.2 mol/L KI) 溶液染色 15 min。用清水将染色液洗净后观察淀粉酶产生的透明圈即可, 每个实验 3 次重复。

1.2.5 总 RNA 制备、RT-PCR 以及 qRT-PCR

总 RNA 的制备:将菌液培养过夜至 $OD_{600} = 0.4$ 后, 用 XVM2 培养基洗菌 2 次, 用 XVM2 培养基诱导 10 min, 之后采用 Trizol 方法提取 RNA。

RT-PCR: 用反转录试剂盒 (Promega, catalog # A3500) 反转录 RNA 为单链 cDNA。

qRT-PCR: 反转后的 cDNA 作为模板, 参考上海翊圣生物科技有限公司 HieffTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix 说明书配制反应体系。

1.2.6 GUS 转录融合构建及酶活性测定实验

构建 GUS 转录融合突变体: 以 *Xcc* 8004 的 DNA 作为模板, 扩增 XC0705 基因起始密码子 ATG 上游除去 SD (Shine-Dalgarno) 序列的 200 bp 基因启动子, 然后通过酶切, 将其与 *gus* 基因、pHMII 载体连接, 得到的重组质粒电击转化至 *Xcc* 野生型或突变体菌株感受态细胞中, 提质粒, 酶切验证正确即为正确菌株。

GUS 酶活测定: 过夜培养细菌将其摇到 OD_{600} 为 0.4, 用 XVM2 培养基洗菌 2 次后, 在 XVM2 环境中诱导 10 min, 取 2 mL 菌液于 1.5 mL 进口 EP 管中, 离心收菌放入液氮中, 保存于 -80°C 。在每管中加入 300 μL PBS, 重悬菌体后加入终浓度为 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟 (PMSF), 进行非接触式超声, 开关各 30 s, 共超声 15 个循环, 高速离心取上清为蛋白样品。用

Coomassie Brilliant Blue G-250 Protein Assay (Bio-Rad) 试剂进行蛋白定量, 根据实际情况稀释蛋白样品。取稀释好的蛋白 10 μL , 加入到 96 孔板中, 迅速加入反应液 (1 mmol/L 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷与 PBS 的混合液), 加入时即开始计时, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 min、10 min、15 min, 时间到时立即加入 200 μL 的 0.4 mol/L Na_2CO_3 至 60 μL 的反应液中终止反应。用酶标仪 (激发波长为 360 nm, 吸收波长为 460 nm) 测定荧光值, 用不同浓度的 4-MUG 的反应产物 4-甲基伞形酮 (4-MU) 作为标准品制作标准曲线, 计算样品中 GUS 的酶活性^[21]。

1.2.7 蛋白的原核表达及纯化

扩增目的片段、连接转化到 pGEM T-easy 载体, 测序正确后, 酶切连接 pET30a 载体, 挑取正确的质粒电击到 BL21 感受态细胞中, 提质粒进行酶切验证, 正确的菌株即为构建好的带有 His₆ 标签的融合蛋白表达菌株。

蛋白的表达: 构建好的菌株摇培到 OD_{600} 为 0.6 左右加入终浓度 0.3 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜诱导, 收集的菌体按 3 mL/g 的比例加入含 20 mmol/L 咪唑的 1 \times Ni-NTA 结合缓冲液中重悬。冰上超声处理至菌体透光后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 收集上清, 即可溶性蛋白提取物。按 5–10 mg/mL 融合蛋白 Ni-NTA His·Bind (Novagen) 树脂的量加入树脂悬液至手动装好的层析柱中, 将离心后的上清加入到平衡好的树脂中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结合 2–3 h。加入含 45 mmol/L 咪唑的 4 mL 1 \times Ni-NTA 漂洗缓冲液洗涤树脂 4 次以洗去杂蛋白, 最后用含 250 mmol/L 咪唑的 1 \times Ni-NTA 洗脱缓冲液洗脱特异性吸附于树脂上的带有 His₆ 标签的融合蛋白, 收集此样品, 进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色验证。

1.2.8 Western blotting

半干转膜: SDS-PAGE 中分离完毕后, 在半干转膜仪 (Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic

Transfer Cell) 进行半干转膜, 小心取出膜用于 Western blotting。

Western blotting: 用 TBST (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 0.1% Tween) 加 5% 脱脂奶粉作为封闭液, 将转膜后的 PVDF 放入其中常温封闭 1 h, 或 4 °C 封闭过夜。后进行一抗孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 之后进行二抗孵育 1 h, 再用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 根据二抗标记物 HRP, 选择用 ECL 底物发光压 X 片显影。

1.2.9 体外 Pull-down 实验

分别纯化蛋白带有 His₆ 标签的 HpaR 和带有 MBP 标签的 XC0449 蛋白, 分别将两个蛋白和混合蛋白加入到 Co-IP 缓冲液中 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 0.2% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, pH 8, 10% glycerol) 和 50 μ L 能特异性吸附 MBP 标签的磁珠中, 混合为终浓度为 10 mmol/L 的 1 mL 混合物, 4 °C 过夜结合。15 min 后离心取上清, 将上清和过夜结合的磁珠以及 MBP 抗体 4 °C 结合 1 h 以上。弃上清, 用 PBS 洗脱 2 次, 再用含 1% Triton 和 1 mmol/L EDTA 的 PBS 洗 2 次后, 加入 1 \times SDS 上样缓冲液煮 8 min 后, 取上清为 Elute 的样品。将每一步洗脱的上清加入 1 \times SDS 上样缓冲液后煮, 和 Elute 一起点样进行 Western blotting 分析。

1.2.10 凝胶迁移阻滞试验 (EMSA)

以基因启动子区为靶标设计引物, 以野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 回收得到目的片段。在 40 μ L 体系中, 加入 1 pmol 的探针, 4 μ L T4 多聚核苷酸激酶 (PNK) 缓冲液以及 1 μ L PNK 酶, 其余部分用水补齐后, 37 °C 标记 1 h。将纯化蛋白、10 \times EMSA 结合缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L KCl, 10 mmol/L DTT) 以及适量的非竞争 DNA 探

针混合在一起, 混匀后室温反应 30 min。加入 300 fmol 标记好的探针至 20 μ L 的反应体系中, 室温反应 30 min。上样于 5% 的 EMSA 非变形 PAGE 胶, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE, 100 V 预电泳 30 min 后上样, 120 V 电泳 1 h 左右。将胶块置于滤纸上, 放入到透明袋中, 置于磷屏上, 压 3 h 左右后扫描检测。

1.2.11 微量热涌动实验 (MST)

按照 Monolith NTTM Protein Labeling Kit RED-NHS (Cat Nr: L001) 试剂盒的方法标记纯化的蛋白。用 MST 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂, 0.05% Tween-20) 成倍稀释标记好的蛋白, 使荧光值在 800–1 200 之间。准备 16 个离心管, 第 2–16 管每个管子中加入 10 μ L MST 缓冲液, 每次需要换枪头取小分子或者是受体蛋白等配体 10 μ L 加入到第一个管子中, 再取 10 μ L 到第 2 个管子中, 轻轻吸打混匀后梯度稀释, 直到最后一个管子中吸打混匀后, 吸出 10 μ L 弃之。在每个管子中加入 10 μ L 稀释好的标记蛋白, 每次需要更换枪头。将每个管子中的溶液混匀, 避免产生气泡后, 用毛细管吸取液体, 上机测量 Monolith NT. Label Free (Nano Temper Technologies GMBH, Germany), LED power 根据蛋白的荧光值调整, MST power 为 80%。扫描结束后, 用 Nano Temper Analysis Software 对实验结果进行分析, 导出数据并作图。

2 结果与分析

2.1 野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 编码 9 个 MarR 家族转录因子

为确定野油菜黄单胞菌 *Xcc* 8004 基因组中含 MarR 家族蛋白的数目, 利用 HMMER2 算法^[6]和 *Xcc* 8004 蛋白组序列信息搜索 Pfam 数据库 (E-value \leq 1.0)。在结果中共搜索得到 9 个编码 MarR 家族的蛋白 (XC0273、XC0363、XC0449、

XC0601、XC1457、XC2827 (HpaR)、XC2840、XC3419 和 XC4254), 这些蛋白都包含典型的 MarR 家族的 DNA 结合结构域, 其 E 值在 $9.10\text{E}-06$ 至 $8\text{E}-20$ 之间, 推测均能发挥转录因子功能。使用 ClustalX 软件对这 9 个 MarR 家族转录因子进行聚类分析, 根据 MEGA7.0 中的最大似然法构建系统发育树, 结果如图 1 所示。系统发育树分析结果表明, XC2827 (HpaR) 与 XC2840 聚在一个分支上, 而 XC0449 与 XC0601 聚在一个分支上。

2.2 MarR 家族转录因子的表达与纯化

利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株和 pET30a 载体系统表达并纯化了 MarR 家族转录因子。重组蛋白在开放读码框 (Open-reading-frame, ORF) C 端带上 His₆ 标签, $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 1 mmol/L IPTG 诱导表达, Western blotting 检测其表达结果。用 Ni-NTA His-Bind 树脂亲和层析, 从表达菌株的粗提液中纯化上述重组蛋白, 用含 40 mmol/L 咪唑的磷酸缓冲液冲洗杂蛋白, 含 250 mmol/L 咪唑的磷酸缓冲液收集洗脱液, 10 kDa 浓缩柱浓缩并置换至蛋

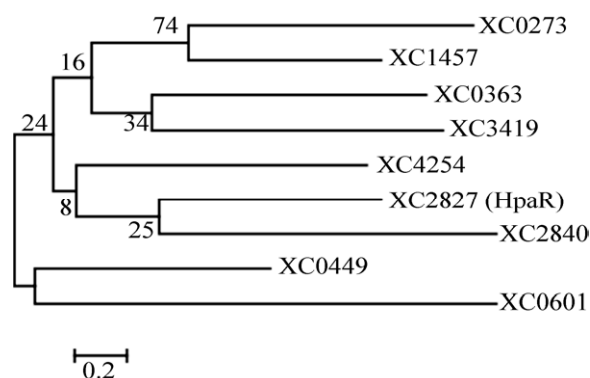


图 1 野油菜黄单胞菌中 MarR 家族转录因子系统发育树分析

Fig. 1 The phylogenetic tree of MarR family in *X. campestris* pv. *campestris* 8004 was inferred using the Maximum Likelihood method. The analysis involved 9 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 135 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5.

白保存液中。如图 2 所示, 除 HpaR 蛋白^[18]以外, 同时还纯化得到纯度在 95% 以上的 MarR 家族转录因子 XC0449, 其理论大小分别是 19.7 kDa (XC0449-His₆) 和 20.0 kDa (HpaR-His₆)。

2.3 在体外 XC0449 与 HpaR 特异性结合

实验室前期研究结果表明, 系统敲除 MarR 家族转录因子后, 除 HpaR^[18]以外, XC0449 突变体同样导致细菌致病力显著下降。既然 HpaR 和 XC0449 都参与到细菌致病途径中, 那么作为转录因子, 它们可能通过相互作用调控同一个致病相关基因, 并在转录水平发生协同或拮抗效应。鉴于以上推测, 我们首先设计了检测 HpaR 和 XC0449 互作的体外实验。如图 3A 所示, 微量热泳动 (Microscale thermophoresis, MST) 实验表明, 体外 XC0449 蛋白与 HpaR 能发生中等强度的特异性结合, 其解离常数 (K_d) 为 $(1.03\pm 0.3)\mu\text{mol/L}$, 而与其他 MarR 家族转录因子在体外并不结合 (图 3B)。推测 XC0449 蛋白可能在体内对 HpaR 的转录活性有特异性的影响。进一步表达并纯化 N 端带有 MBP 标签的 0449 融合蛋白, 进行体外验证蛋白-蛋白互作的 Pull-down 实验。分别将纯化的 HpaR-his₆ 蛋白、MBP-XC0449 蛋白以及能特异性吸附 MBP 标签的磁珠三者混合并在低温

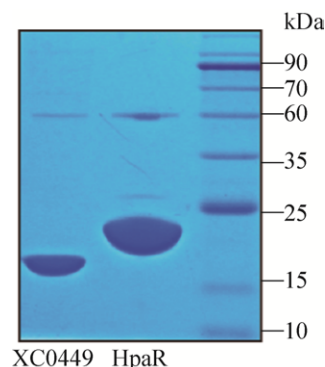


图 2 MarR 家族转录因子的纯化蛋白 XC0449 和 HpaR

Fig. 2 The purified MarR family transcription factors XC0449 and HpaR. The final amount of protein is $10\mu\text{g}$, and the gel was stained with Coomassie Blue.

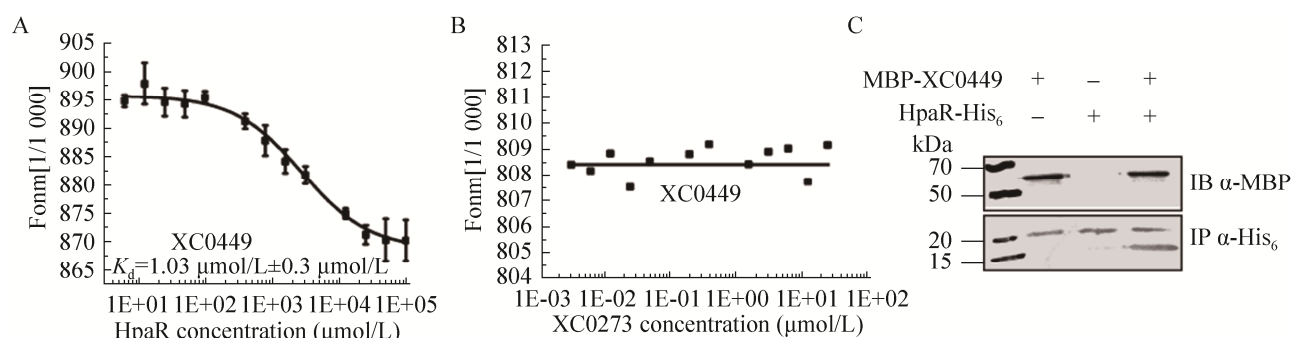


图3 微量热泳动实验 (MST) 和体外 Pull-down 实验证明 XC0449 和 HpaR 之间存在相互作用

Fig. 3 Identification of interaction between HpaR and XC0449 by Microscale thermophoresis (MST) and Pull-down assays. (A) Microscale thermophoresis (MST) analysis revealed the XC0449 binds HpaR. (B) MST analysis revealed the XC0449 does not bind XC0273, which is another MarR family protein and acts as the negative control. Labeled XC0449 protein and diluted HpaR or XC0273 proteins as ligand. The solid curves fit the data points to the standard KD-Fit function. Black bars represented standard deviations. K_d =dissociation constant. The experiments were repeated three times. (C) Pull-down experiment revealed the interaction between HpaR-His₆ and MBP-XC0449. Mix protein represent the fusion protein of HpaR and XC0449. The gel was transferred to PVDF membrane and incubated with different antibodies.

下孵育过夜,通过蛋白-蛋白相互作用获得结合在磁珠上的蛋白复合体,中等离子强度的缓冲液清洗后,SDS 上样缓冲液裂解蛋白复合体,用鼠源 His₆ 单克隆抗体,Western blotting 检测复合体中 HpaR-his₆ 蛋白的存在。实验结果同样表明,在体外 XC0449 能与 HpaR 相互作用 (图 3C)。

2.4 XC0449 调控 Xcc 致病力

为进一步探究 XC0449 基因功能以及与 *hpaR* 可能存在的遗传上下位关系,构建了 XC0449 基因读码框删除突变体以及 XC0449 与 *hpaR* 基因双突变体并进行致病力等表型分析。结果如图 4A 所示, XC0449 单突变体能显著降低 Xcc 对寄主甘蓝的致病性,其致病水平下降至野生型的 50%左右,而 XC0449 与 *hpaR* 双突变体致病表型则与 *hpaR* 单突变体相似,几乎完全丧失。这一结果提示在遗传上, XC0449 位于 *hpaR* 基因的上游或处于另外一条致病力调控的途径上。胞外蛋白酶活性检测发现, XC0449 与 *hpaR* 双突变体表型与 *hpaR* 单突变体相似,与野生型相比,胞外蛋白酶活性均显著上升,而 XC0449 单突变体则无明显变化,表明 XC0449 不参与调控蛋白酶 (图 4B)。

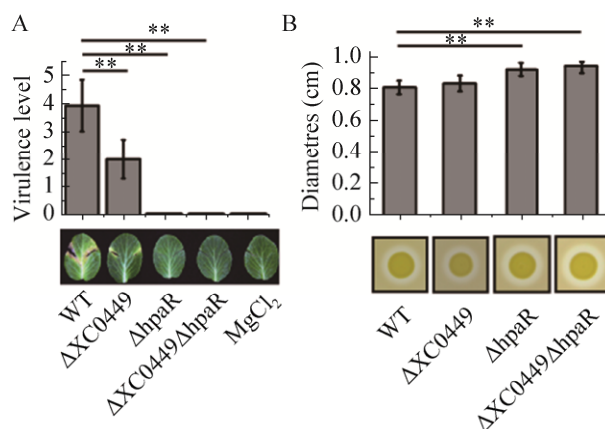


图4 *hpaR* 与 XC0449 表型分析

Fig. 4 The phenotypic characterization of *hpaR* and XC0449. (A) Bacterial virulence against host plant *B. oleracea* cv. Jingfeng No.1. Virulence scores were estimated 10 days after inoculation. Sterile MgCl₂ (10 mmol/L) was inoculated as a negative control. Virulence scores of bacterial strains represent the virulence levels, and were estimated by a semi-quantitative standard. A sterisk indicates significant difference compared with the WT strain ($P < 0.05$, $n = 12$). (B) Assay of extracellular protease production. Error bars were calculated by Student's *t*-test and represented standard deviations ($n = 6$).

2.5 XC0449 协同 HpaR 调控下游基因的表达

既然 HpaR 和 XC0449 在体外能相互作用, 并都参与到细菌致病过程中, 那它们是否可能共同调控同一个致病相关基因? 结合 *XC0449* 与 *hpaR* 单突和双突的表型结果以及实验室已发表的 *hpaR* 调控元的 ChIP-seq 组学数据, 初步确定编码多聚半乳糖醛酸内切酶的 *XC0705* 作为下游靶基因做后续验证。如图 5A 所示, 凝胶迁移实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

表明, 体外 XC0449 和 HpaR 蛋白均能直接结合基因 *XC0705* 的启动子区。进一步分析 XC0449 和 HpaR 与启动子结合后的竞争条带发现, 在加入 100×未标记的 PXC0705 探针后, 与 HpaR 结合的标记探针条带强度明显减弱, 而与 XC0449 结合的标记探针条带则没发生明显变化, 说明 HpaR 竞争 *XC0705* 启动子的能力要强于 XC0449。在加入 1 000×未标记的 PXC0705 探针后, 与 XC0449 结合的标记条带才发生强度明显减弱且位置下

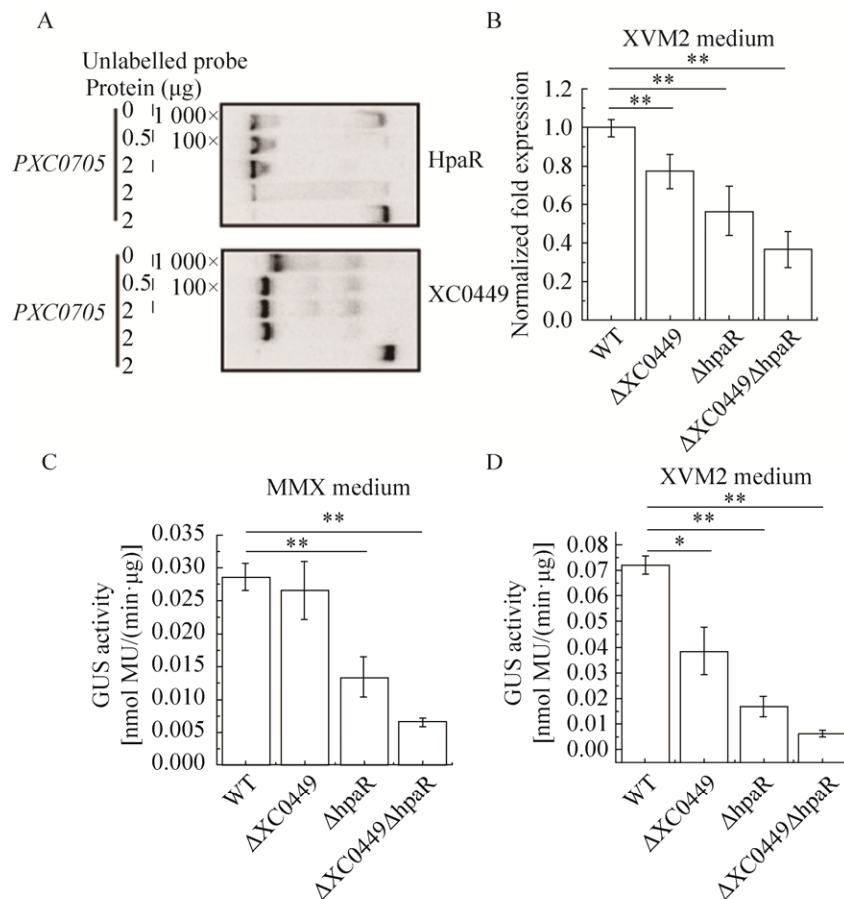


图 5 EMSA、qPCR 及 GUS 检测 HpaR 和 XC0449 对于 *XC0705* 的直接调控

Fig. 5 Identification that HpaR and XC0449 bind to and positively regulate *XC0705* *in vitro* and *in vivo*. (A) Electrophoretic motility shift assay (EMSA) revealed that HpaR and XC0449 protein both can bind the promoter of *XC0705*. The PCR products of the promoter regions of *XC0705* operons was labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP and used as DNA probes in the EMSA. Increasing amounts of unlabeled DNA probes were used as competitors (from 100× to 1 000×). Each experiment was repeated three times. (B) qRT-PCR was used to quantify the mRNA amounts of these genes in different bacterial strains. The amplification of the cDNA of *tmrA* was used as an internal control. (C) and (D) GUS activity assay. Detect the GUS activity after inducing in MMX medium or XVM2 medium for 10 min.

移,也说明 XC0449 与 PXC0705 的结合能力更强。

结合遗传上位分析的结果,推测体内在转录因子通过相互作用调控同一下游基因的过程中,HpaR起着主要作用,而 XC0449 则协同调控 HpaR 发挥功能。如图 5B 所示的 qPCR 结果表明,在三型分泌系统诱导培养基 XVM2 中诱导 10 min 后,和野生型相比,在 XC0449 和 *hpaR* 单突变体中,XC0705 的表达量均显著下降,分别降至野生型中 XC0705 表达量的 78% 和 58%,且双突变体中 XC0705 表达量下降最为严重,降至野生型的 37%,说明 XC0449 和 HpaR 均能正调控 XC0705 的表达,且两者能协同作用使得对下游基因的调控具有叠加效应。我们进一步构建了 XC0705 的 GUS 转录融合突变体,在 XVM2 培养基或 MMX 基本培养基中诱导生长 10 min 后,*hpaR* 单突变体中的 GUS 酶活均显著降低,XC0449 单突变体在 XVM2 中有显著降低,在 MMX 中无显著变化,但 XC0449 和 *hpaR* 双突变体表现则与 qPCR 类似,即协同调控使得下游基因的表达出现了叠加效应。

3 讨论

MarR 家族转录因子早在古生菌和细菌分化之前就已出现,并且在这些物种中普遍存在。在 Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 中 MarR 家族转录因子已在超过 44 000 种细菌和古生菌中收录了超过 335 000 条注释,平均每个基因组大约有 7 个 MarR 家族转录因子。且物种的基因组越大,生活方式越复杂,包含的 MarR 家族转录因子一般就越多^[5]。这说明 MarR 家族转录因子在微生物进化过程中,在响应环境变化并维持自身生存方面发挥着重要作用。本研究生物信息学分析发现,Xcc 8004 基因组一共编码 9 个 MarR 家族转录因子,提示在植物病原细菌致病过程中面临的复杂环境及其可能的依赖于 MarR 家

族转录因子的应对策略。MarR 家族转录因子作为感应各种环境变化的传感器,可以调控多种细胞过程,包括毒力、抗生素、抗胁迫反应、活性氧反应以及有害化合物的降解等等^[22-28]。如弗氏志贺菌 *Shigella flexneri* 中 MarR 家族转录因子 SlyA 在酸胁迫环境下通过激活下游谷氨酸脱羧系统相关基因的表达,最终维持细菌的生存^[29]。当前,MarR 家族转录因子相关研究的热点在于 MarR 蛋白与环境刺激相关的小分子配体的结合影响其与 DNA 双链的结合并改变其结构及活性,从而导致下游基因的表达量的适应性变化^[30]。

除了小分子,MarR 家族转录因子还有可能与哪些生物大分子结合并影响其生化活性?已有研究表明,MarR 家族转录因子 HpaR (XC2827) 在植物病原细菌 Xcc 8004 侵染寄主甘蓝并致病的过程中发挥关键作用^[17]。本研究系统性分析了 Xcc 8004 基因组中编码的 9 个 MarR 家族转录因子,并利用亲和层析纯化了其中的 XC0449 和 HpaR (XC2827)^[18]。体外 MST 和 Pull-down 实验均表明,XC0449 基因编码的转录因子能与 HpaR 相互作用,并协同调控下游致病相关基因 XC0705 的表达。

在体外验证 XC0449 蛋白能结合 XC0705 启动子区的 EMSA 实验中,在加入 1 000×未标记的 PXC0705 探针后与 XC0449 结合的标记条带发生位置下移,而非探针位移条带的曝光量减小或游离的标记探针条带。查阅文献发现,EMSA 胶中出现多个条带或者条带位置的变化,是由于蛋白与探针结合过程中,往往会形成单聚体、二聚体甚至多聚体的形式,因而能在非变形胶上处于不同位置^[33]。对此,推测加入 1 000×竞争性探针后蛋白构象发生变化,由高聚体解聚成低聚体,因而在变性胶中电泳时泳动速度更快,显示为条带位置的下降。

XC0705 编码多聚半乳糖醛酸内切酶

(Endopolygalacturonase), 在植物病原真菌及细菌中的主要功能是在病原菌侵染寄主过程中通过分泌到胞外、降解植物细胞壁从而保证细菌的成功入侵, 因而是细菌重要的毒力因子^[31-32]。本实验室的系统研究发现了直接调控 *XC0705* 表达的两个 MarR 家族转录因子, 在细菌致病过程中能协同激活 *XC0705* 的表达, 最终调控细菌毒力及胞外蛋白酶合成, 从而形成完整的调控通路。

本研究的结果为今后研究和了解 MarR 家族转录因子打下了基础, 同时也为研究其他重要调控基因的相互作用提供了方法和思路。

REFERENCES

- [1] George AM, Levy SB. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol*, 1983, 155(2): 541–548.
- [2] Seoane AS, Levy SB. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1995, 177(12): 3414–3419.
- [3] George AM, Levy SB. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J Bacteriol*, 1983, 155(2): 531–540.
- [4] Cohen SP, McMurtry LM, Hooper DC, et al. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, 33(8): 1318–1325.
- [5] Deochand DK, Grove A. MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52(6): 595–613.
- [6] Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): 279–285.
- [7] Wang D, Guo CJ, Gu LJ, et al. Comparative study of the *marR* genes within the family *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol*, 2014, 52(6): 452–459.
- [8] Alekshun MN, Levy SB, Mealy TR, et al. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(8): 710–714.
- [9] Wilkinson SP, Grove A. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol*, 2006, 8(1): 51–62.
- [10] Perera IC, Grove A. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J Mol Cell Biol*, 2010, 2(5): 243–254.
- [11] Vicente JG, Holub EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol Plant Pathol*, 2013, 14(1): 2–18.
- [12] Typas A, Becker G, Hengge R. The molecular basis of selective promoter activation by the σ^S subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol*, 2007, 63(5): 1296–1306.
- [13] Qian W, Jia Y, Ren SX, et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res*, 2005, 15(6): 757–767.
- [14] Da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 2002, 417(6887): 459–463.
- [15] Rott P, Fleites L, Marlow G, et al. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. *Mol Plant Microbe*

- Interact, 2011, 24(5): 594–605.
- [16] Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(5): 344–355.
- [17] Wei K, Tang DJ, He YQ, et al. *hpaR*, a putative *marR* family transcriptional regulator, is positively controlled by HrpG and HrpX and involved in the pathogenesis, hypersensitive response, and extracellular protease production of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *J Bacteriol*, 2007, 189(5): 2055–2062.
- [18] Pan Y, Liang F, Li RJ, et al. MarR-family transcription factor HpaR controls expression of the *vgrR-vgrS* operon of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2018, 31(3): 299–310.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Dow JM, Clarke BR, Milligan DE, et al. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(10): 2994–2998.
- [21] Wang L, Pan Y, Yuan ZH, et al. Two-component signaling system VgrRS directly senses extracytoplasmic and intracellular iron to control bacterial adaptation under iron depleted stress. *PLoS Pathog*, 2016, 12(12): e1006133.
- [22] Davis JR, Brown BL, Page R, et al. Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(6): 3888–3900.
- [23] Kallscheuer N, Vogt M, Kappelmann J, et al. Identification of the *phd* gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(4): 1871–1881.
- [24] Kim Y, Joachimiak G, Bigelow L, et al. How aromatic compounds block DNA binding of HcaR catabolite regulator. *J Biol Chem*, 2016, 291(25): 13243–13256.
- [25] Weatherspoon-Griffin N, Wing HJ. Characterization of SlyA in *Shigella flexneri* identifies a novel role in virulence. *Infect Immun*, 2016, 84(4): 1073–1082.
- [26] Ellison DW, Miller VL. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(2): 153–159.
- [27] Liu GJ, Liu X, Xu HJ, et al. Structural insights into the redox-sensing mechanism of MarR-type regulator AbfR. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(4): 1598–1608.
- [28] Palm GJ, Chi BK, Waack P, et al. Structural insights into the redox-switch mechanism of the MarR/DUF24-type regulator HypR. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(9): 4178–4192.
- [29] Zhang BY, Ran LH, Wu M, et al. *Shigella flexneri* regulator SlyA controls bacterial acid resistance by directly activating the glutamate decarboxylation system. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2071.
- [30] Grove A. MarR family transcription factors. *Curr Biol*, 2013, 23(4): R142–R143.
- [31] Flego D, Marits R, Eriksson ARB, et al. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13(4): 447–455.
- [32] Ten Have A, Mulder W, Visser J, et al. The endopolygalacturonase gene Bcpgl is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11(10): 1009–1016.
- [33] Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, 2007, 2(8): 1849–1861.

(本文责编 陈宏宇)