

西瓜嗜酸菌 *piL* 菌毛基因的序列分析

林振亚¹, 高必达¹, 赵廷昌²

(1. 湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中国农业科学院 植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘 要:在西瓜嗜酸菌标准菌株 AAC00-1 全基因组序列中选取了 1 个菌毛基因 *piL* 序列, 利用这个基因设计引物, 选取国内外比较有代表性的 7 株西瓜嗜酸菌菌株进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行了测序, 从生物信息学的角度对这 7 个菌株 *piL* 基因的序列特征、同源性、分子聚类、信号肽、疏水性、跨膜结构和二级蛋白结构进行了预测分析。结果表明: Aac5、pslbtw37、W1 和 pslbtw22 *piL* 基因之间的核苷酸氨基酸特征相近, 同源性高, AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376 之间亦如此。预测发现 7 个编码蛋白表现为亲水性, 都无跨膜结构, Aac5、pslbtw37 和 W1 *piL* 基因都存在一个类型为 SPI 的信号肽, 其分泌蛋白所到达的亚细胞位点为 s(即分泌到周质空间)。

关键词:西瓜嗜酸菌; *piL* 基因; 生物信息学分析

中图分类号: S 651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)13-0121-04

瓜类细菌性果斑病(BFB)是西瓜和甜瓜等葫芦科作物上最重要的毁灭性种传病害^[1], 病原菌为西瓜嗜酸菌 (*Acidovorax citrulli*)^[2], 属世界性检疫病害。该病害自 1965 年首次在美国报道以来^[3], 相继在世界多地发生。我国在 1998 年首次报道后^[4], 陆续在全国多省出现, 给西甜瓜产业造成了重大的经济损失。由于该病原菌存在丰富的遗传多样性, 这为瓜类细菌性果斑病的综合防治和抗病品种的筛选增加了困难。

目前对西瓜嗜酸菌的致病机理、种子带菌检测方法、药剂防治及遗传多样性等方面的研究取得了很大进展, 但其病原体与寄主互作的生物学和分子基础方面的研究相对较少。在植物病原菌众多致病因子中, IV 型菌毛的作用越来越受到重视^[5]。它分布于革兰氏阴性细菌的表面, 由多基因编码各种结构性和功能性菌毛蛋白, 在革兰氏阴性细菌的致病过程中发挥作用, 主要涉及病原菌的粘附、定殖、生物膜形成和遗传物质和毒力因子的注入等。迄今, IV 型菌毛功能研究比较成熟的革兰氏阴性菌主要是动物病原菌, 如大肠杆菌、铜绿假单胞菌和奈瑟琳球菌^[6], 而植物病原细菌的 IV 型菌毛功能研究涉及甚少, 没有得到足够的重视。Bahar 等^[7]报道过西瓜嗜酸菌的 IV 型菌毛和其致病力、蹭行运动、生物

膜形成密切相关, 因此对该病原菌的 IV 型菌毛基因的生物信息学分析十分必要。为此该试验从 NCBI 上获得 *Acidovorax citrulli* AAC00-1 全基因组序列中的 1 个菌毛基因 *piL* 序列, 利用这个基因设计引物对 7 株国内外比较有代表性的西瓜嗜酸菌菌株进行 PCR 扩增并对 PCR 产物测序, 采用生物学软件对该 7 个序列进行生物信息分析, 包括序列特征、同源性比较、分子聚类、信号肽、疏水性、跨膜结构和二级蛋白结构。一些基本的生物信息学分析有助于找出可能的致病机理, 研究致病机理为科学防治果斑病提供分子依据, 以期选育和培育抗性品种、新药的研制和开发, 最终从生产上防治该病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_008752)上获得 *Acidovorax citrulli* AAC00-1 全基因组序列中 1 个菌毛基因 *piL* 序列, 利用 Primer Premier 5.0^[8]对这个基因设计引物, 选取国内外比较有代表性的 7 株分离自西瓜的西瓜嗜酸菌菌株(表 1)进行 PCR 扩增并对 PCR 产物进行测序。

表 1 7 株西瓜嗜酸菌菌株来源

Table 1 Source of 7 strains of *Acidovorax citrulli*

菌株	来源	PCR 产物长度/bp
Aac5	台湾	335
pslbtw37	黑龙江哈尔滨	335
W1	以色列	336
pslbtw22	北京大兴	336
AAC00-1	美国佐治亚	335
AAC203-50	洪都拉斯	335
Fc376	美国	332

第一作者简介:林振亚(1988-), 女, 浙江丽水人, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: huanglongya@yahoo. cn.

责任作者:赵廷昌(1964-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 现主要从事植物细菌病害等研究工作。E-mail: tingchangzhao@gmail. com.

基金项目:国家西甜瓜产业技术体系专项资助项目(CARS-36); 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003066)。

收稿日期:2013-03-07

软件: ProtParam、Clustal X(version 1.83)、MEGA 4.1、ProtScale、TMHMM Server v. 2.0、COILS version 2.2、SignalP 3.0 Server、LipoP 1.0、TargetP1.0.1、SSPro 4.0。

1.2 试验方法

1.2.1 理化性质分析 应用软件 ProtParam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)对 7 个菌株序列的理化性质进行在线分析。

1.2.2 同源性比较和聚类分析 应用在线比对方法(http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)将 7 株西瓜嗜酸菌菌株的相应核酸、氨基酸序列进行同源性比对分析。应用 Clustal X(version 1.83)的 Alignment 程序分别对 7 条序列和 1 条外群序列 NC 0011992.1(*Acidovorax ebreus* TPSY)进行多重对位排列(multiple alignments),使用软件 MEGA 4.1^[9]进行构建遗传进化树和系统发育分析,完全删除(complete deletion)对位排列中的缺失数据(missing data)或空位(gaps),采用 Kimura 2-parameter 模式计算遗传距离,分析进化距离用邻位相连法(NJ, neighbor-joining),并进行相应的自展(bootstrap)检验,重复 1 000 次。

1.2.3 疏水性、跨膜结构、卷曲螺旋分析和信号肽预测 应用软件 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)在线分析疏水性(参数选择: Hphob./Kyte &

Doolittle),应用软件 TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线预测跨膜结构域,应用软件 COILS version 2.2(http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)在线预测卷曲螺旋结构,应用软件 SignalP3.0 Server^[10](<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线预测是否存在信号肽及剪切位点,应用 LipoP 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>)预测蛋白质类型,应用 TargetP1.0.1^[11](<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)预测分泌蛋白所到达的亚细胞位点。

1.2.4 二级蛋白结构预测及分析 应用软件 SSPro 4.0(<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>)在线预测蛋白质二级结构并进行分析。

2 结果与分析

2.1 7 株西瓜嗜酸菌菌株 *piL* 基因序列理化性质分析

由表 2 可知,7 个菌株测序序列的 PCR 产物长度、核酸分子质量、GC 含量、氨基酸数和蛋白质分子质量差异不显著, Aac5、pslbtw37、pslbtw22 和 W1 的理论等电点明显低于 AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376。AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376 的负电荷残基总数较正电荷残基总数多,氨基酸序列偏负电荷。7 个菌株氨基酸序列从不稳定系数预测都为不稳定蛋白。

表 2 7 株西瓜嗜酸菌菌株 *piL* 基因序列理化性质比较

Table 2 Comparison of Physicochemical properties among *piL* gene of 7 *Acidovorax citrulli*

菌株	核酸分子质量/Da	GC 含量	氨基酸数	蛋白质分子质量/Da	理论等电点	正/负电荷残基总数	不稳定系数
Aac5	103 362.39a	64.17a	108a	11 668.4a	5.21	10/8	51.54
pslbtw37	103 338.36a	64.47a	108a	11664.4a	5.21	10/8	53.32
W1	103 651.57a	64.28a	109a	11 826.5a	5.71	10/9	51.16
pslbtw22	103 706.62a	63.99a	100ab	10 932.5ab	5.21	10/8	58.95
AAC00-1	103 714.68a	64.17a	110a	12 570.4a	11.60	8/21	60.66
AAC203-50	103 705.67a	64.17a	106a	12 206.1a	11.67	7/22	63.79
Fc376	102 784.06ab	64.76a	106a	12 114.9a	11.63	7/20	64.90

注:同列数据后不同小写字母之间表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 7 株西瓜嗜酸菌菌株 *piL* 基因核苷酸和氨基酸序列同源性比较和聚类分析

由表 3 可知,3 株国内菌株和 W1 之间及另 3 株国外菌株之间的核苷酸氨基酸相似性很高,但是 Aac5、pslbtw37、W1 和 pslbtw22 4 个序列和 AAC00-1、

表 3 7 株西瓜嗜酸菌菌株 *piL* 基因核苷酸和氨基酸序列的相似性比较

Table 3 Nucleotide and putative amino acid

homology comparison among *piL* gene of 7 *Acidovorax citrulli*

对比菌株	Aac5	pslbtw37	W1	pslbtw22	AAC00-1	AAC203-50	Fc376
Aac5		99.1	97.2	89.9	16.1	15.7	15.7
pslbtw37	99.7		96.3	89.9	16.1	15.7	15.7
W1	99.7	99.7		88.1	14.2	14.7	13.8
pslbtw22	98.2	98.5	98.2		13.6	12.0	13.0
AAC00-1	52.7	53.0	51.1	51.9		92.7	95.5
AAC203-50	52.8	53.4	51.1	50.09	98.8		97.2
Fc376	51.6	51.9	50.9	51.7	99.1	99.1	

注:左下角显示核酸相似性,右上角显示氨基酸相似性。

AAC203-50 和 Fc376 3 个序列之间核苷酸的相似性只有 50%左右,氨基酸相似性也非常低,还不到 20%。

从图 1 可以看出,7 个菌株都显示在同一分支上,与外群菌株 NC 0011992.1(*Acidovorax ebreus* TPSY)明显

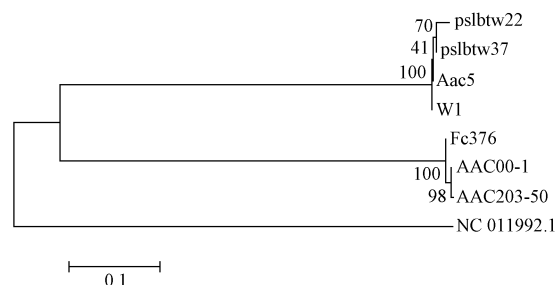


图 1 7 株西瓜嗜酸菌菌株 *piL* 基因序列系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *piL* gene sequence among 7 *Acidovorax citrulli*

区分开,说明了 *pilL* 基因的保守性。Aac5、pslbtw37、W1 和 pslbtw22 被分为 1 群,AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376 归为另 1 群,与它们的理化性质和地理来源基本相一致,体现了该种群内菌株之间的进化关系。

2.3 7 株西瓜嗜酸菌 *pilL* 菌毛蛋白疏水性、卷曲螺旋和跨膜结构分析和信号肽预测

Aac5(图 2)和 pslbtw37、W1 在 1 到 20 位氨基酸之间含有 2 个典型的疏水性区域,pslbtw22 表现为不明显的疏水性,而 AAC00-1(图 3)、AAC203-50 和 Fc376 共有 4 个典型的疏水性区域,在 1 到 20 位氨基酸之间含有 1 个,另外在 80 到 110 位氨基酸之间含有 3 个。7 个菌株序列经预测都不含跨膜结构。卷曲螺旋结构预测显示,AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376 在 20 到 80 氨基酸位点之间含有 1 个。经预测,Aac5 和 pslbtw37、W1 含有 1 个相同的信号肽序列,具体序列为 MTRCLASGVM-LLQSAVTHS,剪切位点位于第 20~21 位氨基酸,表

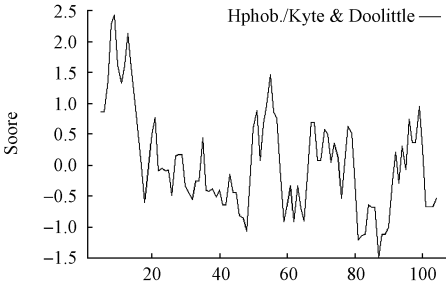


图 2 Aac5 *pilL* 菌毛蛋白疏水性分析
Fig. 2 Analyse of Aac5 *pilL* pili protein hydrophobicity

表 4 7 株西瓜嗜酸菌 *pilL* 菌毛蛋白二级结构预测

Table 4 Prediction of secondary structure of *pilL* pili protein among 7 *Acidovorax citrulli*

菌株	预测的二级结构
Aac5	CCNNHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCHCCCHCCCHCCCHHHHEHE ECCCHHHHEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCC
pslbtw37	CCNNHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCHCCCHCCCHCCCHHHHEHE ECCCHHHHEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCHCCCCC
W1	CCNNHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCHCCCHCCCHCCCHHHHEHE ECCCHHHHEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCC
pslbtw22	CHHHHHHHHHCCCCCECCCCCEEECCCCCHCCCHCCCHCCCHHHHEHEECCCHHHHEHH HHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCCC
AAC00-1	CCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHECCCCCHHHHHHECCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCEEECCCCCEEHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCC
AAC203-50	CCNNHHHHHHHHHHHECCCCCHHHHHHECCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCEEECCCCCEEHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCC
Fc376	CCNNHHHHHHHHHHHECCCCCHHHHHHECCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHCEEECCCCCEEHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCC

注:其中 C 表示 coil(无规则卷曲),H 表示 helix(α螺旋),E 表示 extended(β折叠)。

3 结论与讨论

对 7 株西瓜嗜酸菌菌株进行的生物信息分析结果发现,Aac5、pslbtw37 和 W1 之间以及 AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376 之间的核苷酸、氨基酸等理化指标相似度非常高,pslbtw22 与前三者有一定差异,总体上可以归结为

明成熟肽始于第 20 位氨基酸,经 LipoP 和 TargetP 综合分析,信号肽类型为信号肽酶 I 型(SPI),其分泌蛋白所到达的亚细胞位点为 s(即分泌到周质空间),pslbtw22、AAC00-1、AAC203-50 和 Fc376 则无信号肽。

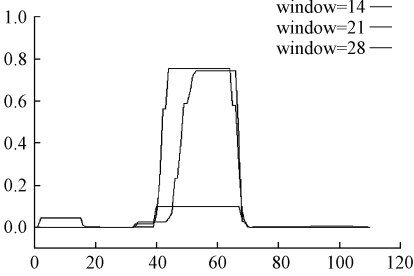


图 3 7 个西瓜嗜酸菌 *pilL* 菌毛蛋白(AAC00-1)跨膜结构域分析
Fig. 3 Prediction of coiled coil regions in *pilL* pili protein among 7 *Acidovorax citrulli* (AAC00-1)

2.4 7 株西瓜嗜酸菌 *pilL* 菌毛蛋白二级结构预测及分析

Aac5、pslbtw37 和 W1 的前 102 个氨基酸的蛋白二级结构一样,W1 比 Aac5 多 1 个无规则卷曲;pslbtw22 和这三者之间的二级结构有一定差异,但总体上还是比较相似。AAC203-5 和 Fc376 的蛋白二级结构相同,AAC00-1 与这二者的二级结构几乎一样,就是多出了第 3~6 个氨基酸上对应的二级结构(表 4)。值得一提的是,前四者的二级结构和后三者的二级结构差异较大,进一步体现了基因序列决定蛋白质的表达。

两大类。系统发育树的聚类结果表明,将外群分开的基础上,根据 *pilL* 菌毛基因序列将 7 个西瓜嗜酸菌聚为 2 类,与它们的地理来源基本相一致,第 1 类除了 W1 都是国内西瓜上分离的菌株,第 2 类都是分离自国外西瓜上的菌株。对该 7 个菌毛蛋白氨基酸序列进行的疏水性、

卷曲螺旋和跨膜结构分析,信号肽预测也同样将它们归为2类,其中pslbtw22比较特殊,总体倾向于国内菌株这个类群。从以上各项结果分析反映了西瓜嗜酸菌在不同菌株之间的遗传进化关系。首先,聚类分析将该7个病原菌菌株与外群菌株NC 0011992.1(*Acidovorax ebreus* TPSY)明显地区分开,充分说明了该*pilL*菌毛基因的稳定性保守性。7个菌株的寄主都是西瓜,但它们*pilL*基因的核苷酸和氨基酸序列的相似度,理化性质以及蛋白质序列分析都显示了菌株之间的差异,可能与它们的地理来源密切相关,反映了该病原菌在不同地域传播流行过程中由于内在因素基因或者外界各种因素发生了突变。

基因突变越小,翻译转录表达的蛋白差异就越小,行使的功能也越一致。目前尚未有对*pilL*基因编码的蛋白功能研究,NCBI上对该基因的蛋白产物注释为假定蛋白,与接合转移区域蛋白相关。对该基因蛋白质序列的分析显示可大致分为2类蛋白(Aac5、pslbtw37、W1和pslbtw22为1类,其中pslbtw22比较特殊,AAC00-1、AAC203-50和Fc376为1类),Aac5、pslbtw37、W1经预测都产生信号肽,为信号肽酶I型(SPI),其分泌蛋白所到达的亚细胞位点为s(即分泌到周质空间),鉴于Bahar等^[7]对西瓜嗜酸菌IV菌毛基因敲除突变的研究,推测该菌毛基因编码的分泌蛋白可能与该病原菌的致病机制有关,在病原菌对寄主的粘附、定殖过程中发挥了重要作用。同时不同菌株的IV型菌毛与病原菌侵染寄主致病力之间的差异有待研究。

对西瓜嗜酸菌的*pilL*基因进行的一些基本生物信息学分析,丰富了其分子水平的资料,有助于对该病原菌的传播侵染机制和致病性等深入研究,为以后选育和

培养抗性品种,新药的研制和开发,最终从生产上防治该病害提供理论依据。

参考文献

- [1] Sowell G J, Schaad N V. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: Seed transmission and resistance of plant introductions[J]. Plant Dis Rep, 1979, 63: 437-441.
- [2] Schaad N W, Postnikova E, Sechler A, et al. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend, *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb nov, *A. citrulli* Schaad et al, 1978) comb nov, and proposal of *A. oryzae* sp. nov[J]. Syst Appl Microbiol, 2008, 31: 434-446.
- [3] Webb R E, Goth R W. A seed borne bacterium isolated from watermelon[J]. Plant Dis Rep, 1965, 49: 818-821.
- [4] 张荣意, 谭志琼, 文衍堂, 等. 西瓜细菌性果斑病症状描述和病原菌鉴定[J]. 热带作物学报, 1998, 19(1): 70-76.
- [5] 顾晓花, 沈策. 革兰阴性细菌IV型菌毛的致病机制研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(5): 342-344.
- [6] Burdman S, Walcott R R. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry[J]. Mol Plant Pathol, 2012, 13(8): 8805-815.
- [7] Bahar O, Goffer T, Burdman S. Type IV pili are required for virulence, twitching motility and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2009, 22: 909-920.
- [8] 任亮, 朱宝芹, 张轶博, 等. 利用软件 Primer Premier 5.0 进行 PCR 引物设计的研究[J]. 锦州医学院学报, 2004, 25(6): 43-46.
- [9] 姜海荣, 倪永清, 宋丽军, 等. 新鲜哈密瓜汁中可培养细菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 426-431.
- [10] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, et al. Identification of prokaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites[J]. Protein Eng, 1997, 10: 1-6.
- [11] Agnieszka S, Juncker H W, Gunnar V H, et al. Predicting sub cellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence[J]. J Mol Biol, 2000, 200: 1005-1016.

Sequence Analysis of *pilL* Gene of *Acidovorax citrulli*

LIN Zhen-ya¹, GAO Bi-da¹, ZHAO Ting-chang²

(1. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: The sequence of a *pilL* gene (locus tag Aave_2768 in whole genome) in standard strain AAC00-1 was downloaded and a pair of primers were designed based on it, the gene encodes a putative type IV pilus protein. 7 representative strains of *Acidovorax citrulli* were used to carry out amplification and PCR fragments were sequenced. The comprehensive bioinformatics analyses including sequence characteristics of DNA and amino acid, identity and homology, molecular clustering, protein physicochemical properties, hydrophobicity, transmembrane helices, signal peptide and protein secondary structural prediction were performed. The results showed that the characteristics of *pilL* at nucleotide and amino acid level were similar among Aac5, pslbtw37, W1 and pslbtw22, so were AAC00-1, AAC203-50 and Fc376. There were not transmembrane helices on 7 coding-protein, but find hydrophilic regions on them. A signal peptide (SPI) were found with Aac5, pslbtw37, W1, and coding-protein were secreted into the periplasmic space.

Key words: *Acidovorax citrulli*; *pilL* gene; bioinformatics analysis