

杨金宏. 桑青枯雷尔氏菌 MR111 的 *GspF* 基因的获取与结构分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 38–40.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2015.07.011

桑青枯雷尔氏菌 MR111 的 *GspF* 基因的获取与结构分析

杨金宏

(安康学院/陕西省蚕桑重点实验室, 陕西安康 725099)

摘要: *GspF* 是细菌 II 型分泌系统的内膜平台的重要蛋白, 利用 PCR 扩增技术, 获得了桑青枯雷尔氏菌 MR111 的含有该类基因功能性结构域的 *GspF* 基因。NCBI 在线 BLASTP 分析发现, 该基因与雷尔氏菌属来源的同源基因的一致性在 90% 以上; 在聚类分析中, 首先所有雷尔氏菌属同源基因聚合在同一分支, 后与皮氏罗尔斯顿菌的同源基因聚合。基因结构分析表明, 该基因有 2 个由 α 螺旋组成的具有高度相似性的、跨膜胞质结构域, 揭示该基因可能参与细菌的跨膜分泌。

关键词: 桑青枯雷尔氏菌; II 型分泌系统; *GspF* 基因; 结构分析

中图分类号: S888.71⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2015)07–0038–03

植物致病细菌 II 型分泌系统 (T2SS) 是由 12 ~ 15 个分泌途径转膜蛋白 (GSP) 基因簇为中心组成的复合体, 向细胞外分泌毒性因子、胞外酶、毒素等许多重要的蛋白质, 通过 2 步将蛋白从细胞内转移到细胞外^[1]。*GspF*、*GspL*、*GspM*、*GspE* 等共同组成 T2SS 的内膜平台, 组装其他分泌元件, 控制分泌通道的开启^[2]。*GspF* 是内膜平台中具有重要作用、并具有广泛分布的胞质膜蛋白, Thomas 等通过分析 *GspF* 的氨基酸序列, 结合欧文氏杆菌 (*Erwinia carotovora*) 的 *GspF* 与 BlaM 融合试验证实 *GspF* 穿过内膜 3 次, 其 N 末端和 C 末端分别位于细胞质和周质^[3]。2007 年 Arts 等进一步通过碱性磷酸酶融合试验证实了绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中 *GspF* 的同源物的拓扑结构, 证实了 *GspF* 是一个质膜蛋白^[4]。2009 年, Abendroth 等对来自霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的 *EpsF* (*GspF* 的同源基因) 的 N 末端的胞质结构域的晶体结构进行了解析, 其由 6 个反向平行 α 螺旋组成。2 个分子 *EpsF* 蛋白的 N–末端结构域形成 1 个紧密的二聚体并具有保守的结合界面^[5]。Peabody 等对大量来自细菌的 *GspF* 基因序列的分析表明, 所有基因类似, 且其 2 个胞质结构域是内部重复序列^[6]。

植物青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的是一种具有严重危害的土传性病害^[7], 本研究以桑青枯雷尔氏菌为研究对象, 获得了桑青枯雷尔氏菌的 *GspF* 基因的序列, 并分析了其结构特征, 为进一步研究桑青枯雷尔氏菌 II 型分泌系统的基因功能和泌出机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

桑青枯雷尔氏菌 MR111 由陕西省蚕桑重点实验室分离培养并保存。细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (DP302) 购自天

根生化科技 (北京) 有限公司。dNTPs、EX *Taq* DNA 聚合酶等为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。培养桑青枯雷尔氏菌用的 TTC 固体培养基和 SPA 液体培养基等相关试剂均为分析纯, 自行配制。

1.2 试验方法

1.2.1 桑青枯雷尔氏菌 MR111 的活化与培养 超低温冰箱取出保存的桑青枯雷尔氏菌, 划线于高压灭菌的 TTC 培养基, 于 26 °C 恒温培养箱中培养过夜, 活化菌株。挑取 TTC 培养基生长的单菌落于 SPA 培养基, 继续置于 26 °C 恒温振荡培养过夜。

1.2.2 桑青枯雷尔氏菌基因组 DNA 的提取与 *GspF* 基因的 PCR 扩增 收集培养过夜的桑青枯雷尔氏菌 MR111, 按细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明提取基因组 DNA, 并以此为模板, 以设计的 *GspF* 基因的 PCR 扩增引物 (F: 5′–CGATATGC–CAGCCTTCC–3′; R: 5′–CGTGACCTGTTGT–TTGA–3′) 进行 PCR 反应, 由于 *Gsp* 基因簇的 GC 含量相对较高 (约 70%), 扩增体系中同时加入 5% 二甲基亚砷 (DMSO), 扩增桑青枯雷尔氏菌的 *GspF* 基因。使用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 检测 PCR 扩增产物, 并将 PCR 扩增产物送上海生工武汉测序部进行测序。

1.2.3 *GspF* 基因序列的分析 NCBI 在线 BLAST 比对桑青枯雷尔氏菌 MR111 的 *GspF* 基因序列^[8], 结合 Rost 等的方法^[9], 分析基因编码氨基酸的结构域, 并下载其他同源基因序列, 进行序列的比对和结构的分析。

2 结果与分析

2.1 桑青枯雷尔氏菌 MR111 的 *GspF* 基因序列的获取

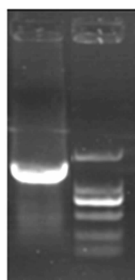
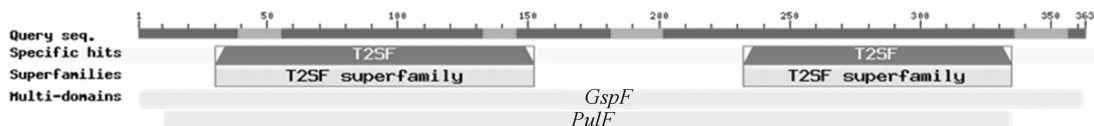
以提取的桑青枯雷尔氏菌的基因组 DNA 为模板, *GspF* 基因扩增引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 结果在 1 000 bp 上方获得单一扩增条带 (图 1)。回收该条带并进行测序, 获得 *GspF* 基因 121 bp 至终止密码子后 49 个碱基共 1 138 bp 的序列 (GenBank 登录号: KM115545)。

NCBI 在线分析基因编码氨基酸, 结果表明同其他基因一样, *GspF* 编码的氨基酸有 2 个具有高度保守性的 T2SF

收稿日期: 2014–07–14

基金项目: 安康学院重点学科核心问题项目 (编号: zdxkzx007)。

作者简介: 杨金宏 (1979–), 男, 山东平度人, 硕士, 讲师, 主要从事蚕桑分子生物学研究。Tel: (0915) 3358007; E-mail: yjhyjhyang@126.com。

图1 *GspF* 基因的PCR扩增图2 预测的 MR111 的 *GspF* 的结构

建 *GspF* 基因的 NJ 系统发育树,结果如图 3 所示。所有青枯雷尔氏菌的 *GspF* 基因聚合后与雷尔氏菌属和罗尔斯顿氏菌的同源基因聚合在一起,而伯克霍尔氏菌单独位于树的最远分支,这与传统分类一致。

2.3 *GspF* 基因结构的分析

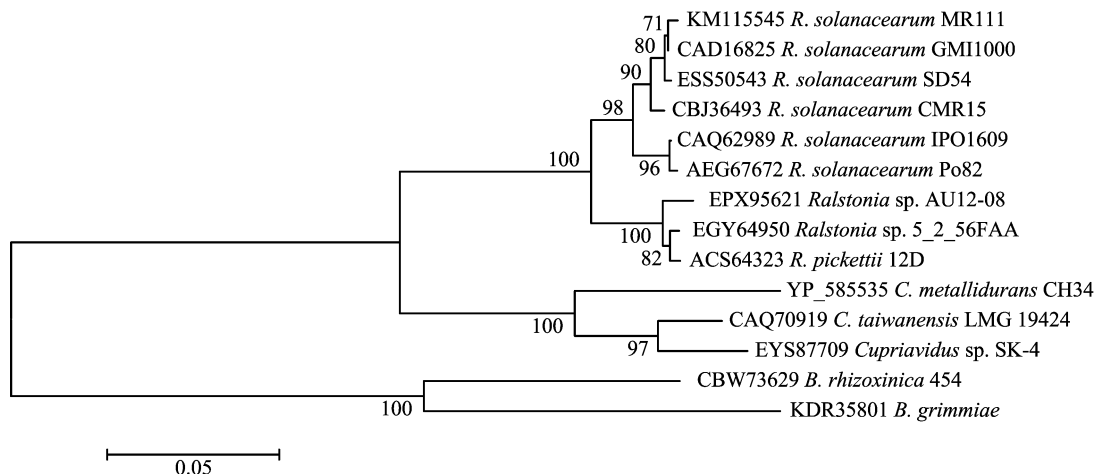
V. cholerae 的 *EpsF* 基因的胞质结构域已通过晶体结构

(pfam00482) 结构、*GspF* (TIGR02120) 结构以及 T2SS 系统的组分 *GspF* 的典型结构 *PulF* (COG1459) (图 2)。

2.2 *GspF* 基因的比对与聚类分析

NCBI 在线 BLASTP 比对分析,*GspF* 基因与其他来源青枯雷尔氏菌、皮氏罗尔斯顿氏菌 (*Ralstonia pickettii*) 等雷尔氏菌属 (*Ralstonia* sp.) 的其他菌株的同源区域的一致性在 90% 以上,与伯克氏菌属 (*Cupriavidus* sp.)、伯克霍尔氏菌 (*Burkholderia* sp.) 等的相似性在均在 80% 以上。MEGA 5.0 软件^[10] 构

进行解析,本研究结合 BLAST 比对和 Rost 等的方法^[8-9] 分析基因结构,结果 2 个基因的 2 个胞质结构域的相似性均在 80% 以上(图 4-A、B),*GspF* 的前后 2 个胞质结构域间的相似性也在 50% 以上(图 4-C),基因的 C 端、N 端都具有 6 个 α 螺旋, Met(171)、Val(192) 之间具有跨膜螺旋结构。这与 Peabody 等分析的 2 个胞质结构域是内部重复序列一致^[6]。

图3 基于 *GspF* 基因的系统发育树

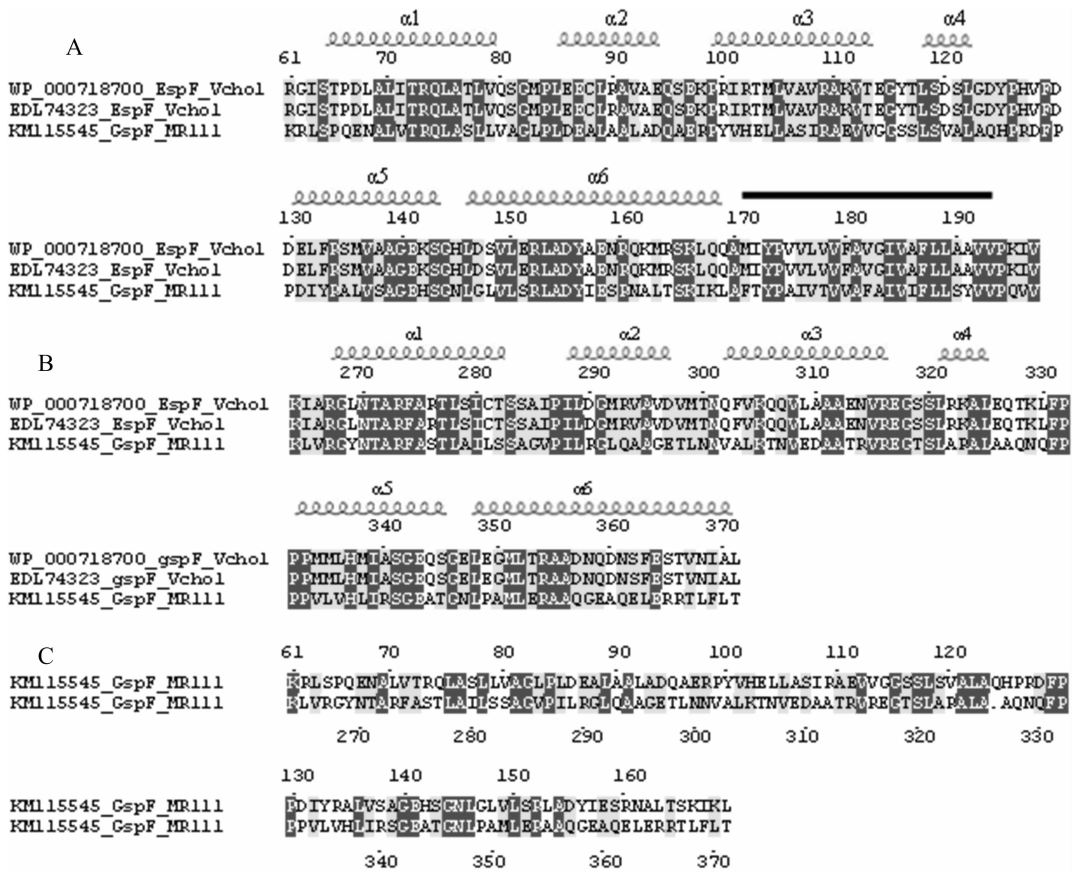
3 讨论与结论

革兰氏阴性菌中,细菌的跨膜分泌蛋白占细胞总蛋白的 20%,与细菌毒素分泌到胞、表达细胞表面的膜蛋白等生命活动有关^[11]。目前已经在革兰氏阴性菌中发现 7 种蛋白分泌机制,其中 II 型分泌系统在革兰氏阴性细菌中广泛存在,该分泌系统以转膜蛋白 *GSP* 基因簇为中心,突变会造成许多蛋白分泌的缺乏^[12-13]。本研究获得的桑青枯雷尔氏菌的 *GspF* 是具有广泛分布的胞质膜蛋白, BLAST 软件分析 *GspF* (*EpsF*) 基因间具有高度的相似性, MR111 的 *GspF* 基因与其他来源青枯雷尔氏菌、皮氏罗尔斯顿氏菌以及雷尔氏菌属的其他菌株的同源区域的一致性在 90% 以上。基于该基因进行聚类分析,所有雷尔氏菌属聚合后再与罗尔斯顿氏菌的同源基因聚合,伯克霍尔氏菌单独位于树的最远分支,说

明 *GspF* 基因的进化与细菌的进化是一致的,没有经历基因的水平转移^[14]。

作为组成 T2SS 内膜平台的蛋白之一, *GspF* 基因存在于所有的 T2SS 分泌系统中^[1,15], *V. cholerae* 的基因 *EpsF* 的二级结构中存在 6 个反向平行螺旋,形成具有多个 α 螺旋构成的跨膜区,把疏水基团放在骨架外侧,而亲水基团位于螺旋内侧,与有疏水性的脂双层结构的细胞膜融合,实现穿过细胞膜的分泌^[5]。*EpsF* 与 *GspF* 形成 α 螺旋的胞质结构域内的相似性在 80% 以上, *GspF* 的 2 个胞质结构域也具有 50% 以上相似性,均体现了作为分泌系统的重要组成基因在基因序列和结构上的保守性。

本研究通过 PCR 技术获得了桑青枯雷尔氏菌 MR111 的 *GspF* 基因,并分析了基因间的相似性和结构特征,为进一步研究该菌的分泌机制奠定了基础。



横线标出的Met(171)-Val(192)间序列为预测的跨膜螺旋结构，黑色为一致氨基酸，灰色为相似氨基酸

图4 *GspF* 基因N末端 (A)、C末端 (B) 和内部 (C) 胞质结构域的多序列比对

参考文献:

- [1] Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis[J]. Infect Immun, 2001, 69(6): 3523–3535.
- [2] Lory S. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting[J]. Current Opinion in Microbiology, 1998, 1(1): 27–35.
- [3] Thomas J D, Reeves P J, Salmond G P. The general secretion pathway of *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*: Analysis of the membrane topology of OutC and OutF[J]. Microbiology, 1997, 143(3): 713–720.
- [4] Arts J, De Groot A, Ball G, et al. Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (*GspF*) [J]. Microbiology (Reading, England), 2007, 153(Pt 5): 1582–1592.
- [5] Abendroth J, Mitchell D D, Korotkov K V, et al. The three-dimensional structure of the cytoplasmic domains of *EpsF* from the type 2 secretion system of *Vibrio cholerae* [J]. Journal of Structural Biology, 2009, 166(3): 303–315.
- [6] Peabody C R, Chung Y J, Yen M R, et al. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella[J]. Microbiology, 2003, 149(11): 3051–3072.
- [7] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65–87.
- [8] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [9] Rost B, Casadio R, Fariselli P, et al. Prediction of helical transmembrane segments at 95% accuracy [J]. Protein Science, 1995, 4(3): 521–533.
- [10] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [11] Desvaux M, Parham N J, Scott-Tucker A, et al. The general secretory pathway: a general misnomer? [J]. Trends in Microbiology, 2004, 12(7): 306–309.
- [12] Genin S, Boucher C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome [J]. Mol Plant Pathol, 2002, 3(3): 111–118.
- [13] Genin S, Boucher C. Lessons learned from the genome analysis of *ralstonia solanacearum* [J]. Annu Rev Phytopathol, 2004, 42: 107–134.
- [14] van Reenen C A, Dicks L M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(3): 157–168.
- [15] Chial M, Ghysels B, Beatson S A et al. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology, 2003, 149(4): 821–31.