

韩长志. 希金斯炭疽菌磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 177–180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.046

希金斯炭疽菌磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 生物信息学分析

韩长志

(西南林业大学林学院云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要:希金斯炭疽菌侵染菜心、萝卜等十字花科植物引起炭疽病, 给各国农业生产造成了巨大的经济损失。基于酿酒酵母典型的磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 序列, 利用 Blastp 以及关键词对该菌蛋白质数据库进行比对、搜索, 以及通过 SMART 分析, 明确该菌存在 8 个典型的 PI-PLC 序列; 通过生物信息学分析, 明确上述 PI-PLC 序列在蛋白质二级结构组成、信号肽等方面均具有一定差异。遗传关系比较分析明确该菌中的 PI-PLC 序列与禾谷炭疽菌 (*Colletotrichum graminicola*)、松针炭疽菌 (*C. fioriniae*) 等炭疽菌属中的病菌具有较近的亲缘关系。

关键词:希金斯炭疽菌; 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C; 亚细胞定位; 二级结构; 炭疽菌属

中图分类号:S432.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0177-04

植物与病原菌互作过程中, 众多细胞信号转导途径参与其中, 现已明确 G 蛋白信号途径及其下游的 MAPK 信号传导途径和 cAMP 信号传导途径具有重要的作用。因此, 学术界关于真菌 RGS 的研究产生了较多成果^[1], 磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 的一种异构体 PI-PLC β 为磷脂肌醇信号途径 PKC 系统中的重要效应物^[2], 可以将 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇水解为三磷酸肌醇和二酰甘油, 而上述分子均作为细胞信号转导的第二信使, 发挥着重要作用。

希金斯炭疽菌 (*Colletotrichum higginsanum* Sacc.) 可以侵染菜心、萝卜等十字花科蔬菜引起炭疽病, 该菌现主要分布于美国、日本、印度等国家^[3-5], 在我国, 由该菌侵染菜心引起的炭疽病成为影响菜心产量和品质的重要危害之一^[6]。国内外对该菌的研究主要集中在病菌的生物学特性^[7]、生防菌筛选^[8]、遗传转化^[9-10]以及不同营养元素(硅、氮、钾等)^[11-14]、外源酚酸类物质 pHBA^[15]控制病害等方面, 同时, 随着该基因

组序列的释放^[16], 林春花等对其开展了 MAPK 途径相关基因的找寻及信号通路简图的绘制工作^[17], 韩长志对其进行了 RGS^[18]、14-3-3^[19]、sepin^[20]、AC、PITP 等蛋白生物信息学分析。此外, 对于该菌致病基因的研究, 建立根癌农杆菌介导的转化技术及直接重复重组介导的基因打靶等技术^[9-10]。华中农业大学黄俊斌教授实验室建立了希金斯炭疽菌转化子的突变体库, 为进一步对这些转化子基因功能研究提供了技术支持^[21-22]。然而, 对于该菌中存在的 PI-PLC 数量、功能尚不清楚。本研究利用酿酒酵母 S288c (*Saccharomyces cerevisiae* S288c) 中已经报道的 PI-PLC 氨基酸序列, 通过在炭疽菌属蛋白质数据库中进行 Blastp 比对分析^[23], 以及通过关键词搜索, 获得与酿酒酵母 PI-PLC 同源的希金斯炭疽菌序列, 并通过保守结构域分析、疏水性分析、二级结构预测位等生物信息学分析以及遗传关系分析, 以期为进一步开展希金斯炭疽病菌的研究提供重要的指导。

1 材料与与方法

1.1 材料

根据酿酒酵母 S288c 中含有的 1 个 PI-PLC 氨基酸序列, 利用炭疽菌属蛋白质数据库在线 Blastp 比对, 同时通过输入“phosphatidylinositol-specific Phospholipase”“Phospholipase C”“PLC”关键词在上述数据库中进行检索 PLC(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 保守结构域预测 利用 SMART 网站^[24]在线分析

收稿日期: 2015-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31560211); 云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(编号: ZK150004); 云南省优势特点重点学科生物学一级学科建设项目(编号: 50097505); 云南省高校林下生物资源保护及科用科技创新团队项目(编号: 2014015); 云南省教育厅科学研究基金(编号: 2014Y330)。

作者简介: 韩长志(1981—), 男, 河北石家庄人, 博士, 讲师, 主要从事经济林木病害生物防治与真菌分子生物学研究。Tel: (0871) 63862918; E-mail: hanchangzhi2010@163.com。

[8] 王兆振, 毕亚玲, 丛 聪. 除草剂对作物的药害研究[J]. 农药科学与管理, 2013, 34(5): 68–73.

[9] 张 静. 我国除草剂的登记现状及其发展趋势分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.

[10] 金景学. 杂草抗性发展趋势及杂草综合管理策略[J]. 湖北植保, 2012(6): 56–58.

[11] James C. Global status and distribution of commercial transgenic crop in 1997 [J]. Biotechnology Development Monitor, 1998(35): 9–12.

[12] Owen M D K. North America Development in herbicide resistant crops [C]. Brighton, England: British Crop Protection Conference, 1997: 955–963.

[13] Kudsk P, Streibig J C. Herbicides – a two-edged sword [J]. Weed Research, 2003, 43(2): 90–102.

[14] Aliakbari F, Karami – osboo R, Mazhar S F, et al. Essential oils usage as a natural pesticide. Journal of Biotechnology, 2010, 150(3): 481.

PI-PLC 所具有的保守结构域特征。

1.2.2 蛋白质疏水性预测 利用 Protscale 程序^[25]对 PI-PLC 进行疏水性测定。

1.2.3 蛋白质转运肽及信号肽预测 对蛋白质转运肽的预测利用 TargetP 1.1 Server 在线分析实现^[26],信号肽的预测则是利用 SignalP 3.0 Server^[27]在线分析实现。

1.2.4 蛋白质二级结构及跨膜区结构预测 对蛋白质二级结构预测采用 PHD^[28]在线分析实现,利用 TMHMM Server v.2.0^[27]实现 PI-PLC 的跨膜区结构预测。

1.2.5 亚细胞定位分析 利用 ProtComp v 9.0 实现 PI-PLC 的亚细胞定位分析^[29]。

1.2.6 系统进化树构建 在 NCBI 中,以希金斯炭疽菌中所含 PI-PLC 氨基酸序列为基础,在线进行 Blastp 同源搜索,获得来自不同物种的同源蛋白质序列。对所获得的同源序列,利用 ClustalX^[30]进行多重比对分析,随后利用 MEGA 5.2.2 软件^[31]构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 希金斯炭疽菌中 8 个 PI-PLC 均具有典型的 PLCXc 或者 PLCYc 保守结构域

通过 Blastp 比对分析,共获得 10 个同源序列,同时,利用 3 个关键词搜索,分别获得 8、9、7 个蛋白序列,对上述蛋白进行整理、去除重复,共获得 9 个蛋白,其 ID 分别为 CH063_08309.1、CH063_07411.1、CH063_07011.1、CH063_05432.1、CH063_04045.1、CH063_03075.1、CH063_02624.1、CH063_00149.1、CH063_00100.1(表 1)。其中,发现一个蛋白序列(CH063_04045.1)仅可以通过 Phospholipase-C 搜索到,不能通过“phosphatidylinositol-specific Phospholipase”“PLC”搜索到,该蛋白通过 Blastp 也未能比对到,有待于进一步核实;随后,利用 SMART 在线分析,结果显示,仅有 8 条序列具有典型的 PLCXc 保守域结构,同时还具有诸如 PLCYc、C2 等保守结构域(图 1)。

对 CH063_04045.1 进行深入分析,明确该蛋白为肌醇鞘磷脂磷脂酶 C,并不是 G 蛋白下游的效应因子,同时,基于 SMART 分析,该蛋白并不含有磷脂酶所含有的保守 PLCXc 或者 PLCYc 结构域,因此将该蛋白排除。根据上述分析,共获得 8 条蛋白序列,依据其氨基酸大小进行排序,分别将其命名为 ChPLC1、ChPLC2、ChPLC3、ChPLC4、ChPLC5、ChPLC6、ChPLC7、ChPLC8(表 1)。

表 1 PLC 的基本信息及获取方法

ID	名称	蛋白质 登录号	位置	氨基酸 长度(个)	基因序列 长度(nt)	功能	获取方法
CH063_08309.1	ChPLC1	CCF36833	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 2740;380-1033 +	217	654	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma 2	关键词搜索、Blastp
CH063_07011.1	ChPLC2	CCF35172	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 2076;3373-4428 -	351	1 056	phosphatidylinositol-specific phospholipase C	关键词搜索
CH063_00149.1	ChPLC3	CCF33523.1	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 14;28355-29710 +	451	1 356	phosphatidylinositol-specific phospholipase C	关键词搜索、Blastp
CH063_02624.1	ChPLC4	CCF41577.1	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 509;10603-12018 +	471	1 416	phosphatidylinositol-specific phospholipase C	Phospholipase-C、phosphatidylinositol-specific Phospholipase
CH063_03075.1	ChPLC5	CCF43448	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 628;9810-11297 +	495	1 488	phospholipase C	关键词搜索、Blastp
CH063_00100.1	ChPLC6	CCF47882.1	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 9;29167-31382 +	696	2 216	phosphatidylinositol-specific phospholipase C	关键词搜索、Blastp
CH063_05432.1	ChPLC7	CCF33181.1	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 1389;2560-4943 -	712	2 384	phosphatidylinositol-specific phospholipase C	关键词搜索、Blastp
CH063_07411.1	ChPLC8	CCF35680.1	C. higginsianum IMI 349063; Supercontig 2267;1179-4553 -	1 124	3 375	phosphatidylinositol-specific phospholipase C	关键词搜索、Blastp

注:关键词搜索包括使用“Phosphatidylinositol-specific phospholipase”“Phospholipase C”“PLC”词搜索。

2.2 ChPLC2 具有典型的信号肽区域

通过 SignalP 分析,除 ChPLC2 在 N 端含有 1 个典型信号肽序列外,其他 PI-PLC 均不含有信号肽;同时,通过 TMHMM 分析,除 ChPLC2 在 N 端含有 1 个跨膜结构域外,其他 PI-PLC 均不含有跨膜结构域(图 1),鉴于 TMHMM 不能将蛋白中所含的信号肽与跨膜结构域严格区分,因此,ChPLC2 在 N 端含有的序列结构是信号肽,而不是由 TMHMM、SMART 程序所预测的跨膜结构域(图 1)。

2.3 希金斯炭疽菌 PI-PLC 均为亲水性蛋白

通过疏水性分析,明确 ChPLC1 和 ChPLC2、ChPLC3 和 ChPLC6、ChPLC4 和 ChPLC5 在疏水性最强氨基酸残基上相同,分别为 L、I、V;ChPLC1 和 ChPLC8、ChPLC4 和 ChPLC6 在

亲水性最强氨基酸残基上相同,分别为 R、E(表 2)。尽管如此,其他 PI-PLC 彼此之间在亲(疏)水性最强氨基酸残基及位置方面仍然存在较大的差异(表 2、图 2),推测在细胞信号转导过程中,PI-PLC 所具有的功能存在一定的差异性。

2.4 二级结构分析

明确 8 个 PI-PLC 均含有无规卷曲、α-螺旋以及 β-转角,所占比例不尽相同。就所含的无规卷曲比例而言,ChPLC2 最低,为 17%,ChPLC8 最高,为 45%,其他 PI-PLC 所含比例集中于 20%~35%;就所含的 α-螺旋而言,ChPLC1 最低,为 5%,ChPLC7 最高,为 41%,其他 PI-PLC 所含比例集中于 20%~40%;就 β-转角而言,ChPLC3 最低,为 5%,ChPLC1 最高,为 44%,其他 PI-PLC 所含比例集中于

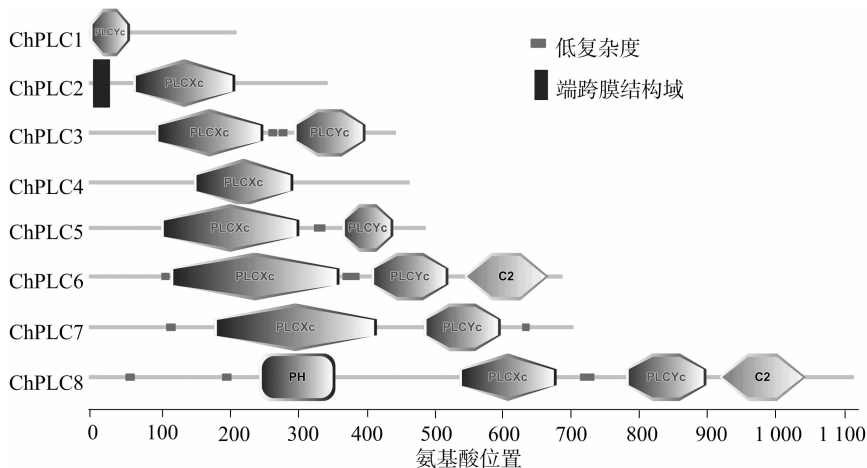


图1 PI-PLC 保守结构域分析

表 2 PI-PLC 疏水性及亲水性氨基酸残基位置情况

PI-PLC	亲水性最强氨基酸			疏水性最强氨基酸			疏水性氨基酸 残基数值总和	亲水性氨基酸 残基数值总和
	残基	位置	数值	残基	位置	数值		
ChPLC1	R	118	-1.616	L	185	1.795	30.13	-93.330
ChPLC2	R、K	192、193	-1.916	L	17	2.684	82.545	-142.133
ChPLC3	A、R	281、282	-2.847	I	385	0.663	20.856	-316.271
ChPLC4	E	261	-1.853	V	131	0.979	39.477	-219.550
ChPLC5	D、A	327、328	-1.889	V	257	1.111	41.303	-245.036
ChPLC6	E	606	-2.753	I	315	0.995	46.227	-364.447
ChPLC7	G	13	-2.116	C	489	0.995	31.715	-466.596

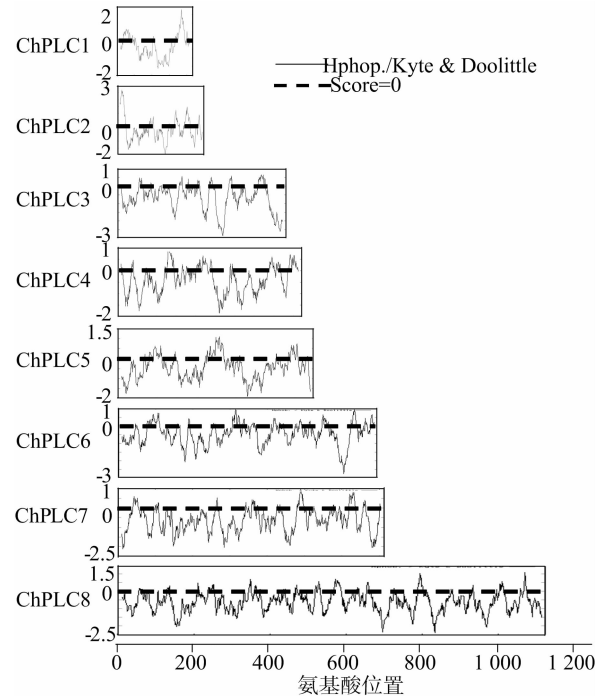


图2 PI-PLC 疏水性分析

5% ~ 25% (图3)。

2.5 转运肽及亚细胞定位分析

转运肽分析结果显示,除 ChPLC2 明确定位于分泌途径, ChPLC1、ChPLC4、ChPLC7 定位于线粒体,其他 PI-PLC 定位在任何位置(表3)。为了更好地明确 PI-PLC 的亚细胞定位,利用 ProtComp 进行分析,结果显示,ChPLC1、ChPLC7 定位于线粒体,这与通过 TargetP 预测结果相同,ChPLC2 定位于

细胞膜,ChPLC3、ChPLC6 定位于细胞核,ChPLC4、ChPLC5、ChPLC7 定位于细胞质中(数据未显示)。上述定位预测结果说明希金炭疽菌中数量众多的 PI-PLC 定位情况不尽相同,在细胞信号转导过程中发挥着不同的功能。

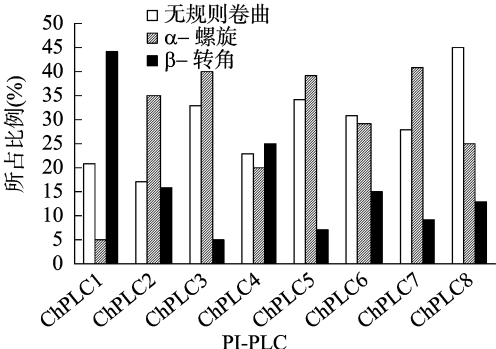


图3 PI-PLC 二级结构域预测

表 3 PI-PLC 含有潜在转运肽的可能性预测结果

PI-PLC	叶绿体 转运肽	线粒体 目标肽	分泌途径 信号肽	定位情况	预测概率 (%)
ChPLC1	0.409	0.196	0.263	M	<20
ChPLC2	0.015	0.967	0.039	S	>80
ChPLC3	0.088	0.101	0.876	-	60~80
ChPLC4	0.559	0.084	0.278	M	20~40
ChPLC5	0.090	0.061	0.915	-	>80
ChPLC6	0.090	0.050	0.930	-	>80
ChPLC7	0.605	0.039	0.462	M	<20
ChPLC8	0.492	0.042	0.493	-	<20

2.6 遗传关系分析

通过在 NCBI 中对 PI-PLC 进行 Blastp 比对,获得与希

金斯炭疽菌 PI - PLC 的同源序列,选择炭疽菌属真菌其他序列进行遗传关系分析。结果显示,就物种之间关系而言,该菌中的 PI - PLC 与禾谷炭疽菌、松针炭疽菌亲缘关系较近;就该菌中的 PI - PLC 之间的关系而言,8 个 PI - PLC 可以大致聚为五大类,具体而言,ChPLC6、ChPLC5、ChPLC7 关系较近,为一类;ChPLC3 与 ChPLC1 关系较近,为一类;ChPLC8、ChPLC4、ChPLC6 各为一类。

3 结论与讨论

随着希金斯炭疽菌全基因组序列的释放^[16],为深入解析该菌致病因子研究提供了重要的数据支撑,一些涉及 G 蛋白信号转导途径上的重要效应物^[18,32]以及 MAPK 途径上的重要蛋白得到进一步明确^[17]。本研究基于前人研究成果,明确了该菌中存在 7 个典型的 PI - PLC,初步明确了上述蛋白具有典型的 PLCXc、PLCYc、C2 等保守结构域、均为亲水性蛋白等特点。尽管如此,希金斯炭疽菌中 8 个 PI - PLC 彼此之间在亚细胞定位、信号肽、二级结构组成方面存在一定差异,推测上述蛋白在不同位置发挥不同作用,同时,对上述 PI - PLC 与其他物种进行遗传关系分析,明确希金斯炭疽菌与松针炭疽菌亲缘关系较近,为进一步深入研究其他炭疽菌属真菌 PI - PLC 打下坚实的理论基础。通过深入解析希金斯炭疽菌中 G 蛋白信号转导过程中的致病因子,有助于为开发用于以 G 蛋白信号通路为作用靶标的化学药剂提供重要的理论意义。

参考文献:

- [1] 赵勇,王云川,蒋德伟,等. 真菌 G 蛋白信号调控蛋白的功能研究进展[J]. 微生物学通报,2014,41(4):712-718.
- [2] 孙大业,崔素娟,孙颖. 细胞信号转导——基础篇[M]. 4 版. 北京:科学出版社,2010.
- [3] 沈瑞清,张萍,郭成瑾,等. 宁夏炭疽菌属真菌资源研究[J]. 河南农业科学,2012,41(5):100-102,149.
- [4] 梁惠凌,唐辉. 广西常见花卉真菌性病害的防治[J]. 广西园艺,2002(2):18-19.
- [5] Hyde K, Cai L, Cannon P, et al. *Colletotrichum*—names in current use[J]. Fungal Diversity,2009,39(1):147-182.
- [6] 卢博彬,杨暹. 菜心炭疽病研究进展[J]. 长江蔬菜,2009(24):1-5.
- [7] 周而勋,杨媚,张华,等. 菜心炭疽病菌菌丝生长、产孢和孢子萌发的影响因素[J]. 南京农业大学学报,2002,25(2):47-51.
- [8] 况福元,吴小丽,吕凤青,等. 菜心炭疽病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报,2009,36(9):1350-1355.
- [9] Huser A, Takahara H, Schmalenbach W, et al. Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis[J]. Molecular Plant - Microbe Interactions,2009,22(2):143-156.
- [10] Ushimaru T, Terada H, Tsuboi K, et al. Development of an efficient gene targeting system in *Colletotrichum higginsianum* using a non-homologous end-joining mutant and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer[J]. Molecular Genetics and Genomics,2010,284(5):357-371.
- [11] 杨暹,冯红贤,杨跃生. 硅对菜心炭疽病发生、菜薹形成及硅吸收沉积的影响[J]. 应用生态学报,2008,19(5):1006-1012.
- [12] 杨暹,陈晓燕,冯红贤. 氮营养对菜心炭疽病抗性生理的影响 I. 氮营养对菜心炭疽病及细胞保护酶的影响[J]. 华南农业大学学报,2004,25(2):26-30.
- [13] 陈晓燕,杨暹,张璐璐. 氮营养对菜心炭疽病抗性生理的影响 II. 氮营养对菜心炭疽病及膜脂过氧化作用的影响[J]. 华南农业大学学报,2004,25(3):1-5.
- [14] 郭巨先,刘玉涛,杨暹. 钾营养对菜薹(菜心)炭疽病发生和植株防御酶活性的影响[J]. 中国蔬菜,2012(14):86-89.
- [15] 康云艳,周小萌,杨暹,等. pHBA 对菜心炭疽病的诱导抗性及其植株生理特性的影响[J]. 植物病理学报,2014,44(4):393-404.
- [16] O'Connell R J, Thon M R, Hacquard S, et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses[J]. Nature Genetics,2012,44(9):1060-1065.
- [17] 林春花,蔡志英,黄贵修. 全基因组法绘制禾谷炭疽菌和希金斯炭疽菌中 MAPK 级联信号途径简图[J]. 热带作物学报,2012,33(4):674-680.
- [18] 韩长志. 希金斯炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析[J]. 生物技术,2014,24(1):36-41.
- [19] 韩长志. 希金斯炭疽菌 14-3-3 蛋白生物信息学分析[J]. 湖北农业科学,2014,3(15):3669-3672.
- [20] 韩长志. 希金斯炭疽菌中五个典型 septin 生物信息学分析[J]. 河南农业科学,2014,43(8):91-96.
- [21] 周鹏. 希金斯刺盘孢 T - DNA 插入体库的构建、筛选及相关突变体基因的克隆[D]. 武汉:华中农业大学,2011.
- [22] 赵典. 希金斯刺盘孢 T - DNA 插入体库的筛选及相关突变体基因的克隆[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
- [23] Altschul S F, Madden T L, Schaffer 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.
- [24] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research,2012,40(D1):D302-D305.
- [25] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server[M]. The proteomics protocols handbook: Springer,2005:571-607.
- [26] Emanuelsson O, Brunak S, Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools[J]. Nature Protocols,2007,2(4):953-971.
- [27] Bendtsen J D, Nielsen H, Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. Journal of Molecular Biology,2004,340(4):783-795.
- [28] Kelley L A, Sternberg M J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. Nat Protoc,2009,4(3):363-371.
- [29] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N - terminal amino acid sequence[J]. Journal of Molecular Biology,2000,300(4):1005-1016.
- [30] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[M]//Current Protocols in Bioinformatics,2002.
- [31] 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 Evolution,2011,28(10):2731-2739.
- [32] 韩长志. 禾谷炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析[J]. 微生物学通报,2014,41(8):1582-1594.