

张馨怡,郭宝佃,韩晨阳,等. 猕猴桃溃疡病菌 III 型效应蛋白 HopAH1 的三维结构与生化功能分析[J]. 江苏农业科学,2024,52(12):121-127.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.12.016

# 猕猴桃溃疡病菌 III 型效应蛋白 HopAH1 的三维结构与生化功能分析

张馨怡<sup>1</sup>, 郭宝佃<sup>2</sup>, 韩晨阳<sup>3</sup>, 赵延存<sup>2</sup>, 刘凤权<sup>1,2</sup>

(1. 海南大学热带农林学院,海南海口 570228; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014;

3. 南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095)

**摘要:**猕猴桃溃疡病危害严重,影响猕猴桃的产量。对猕猴桃溃疡病菌 14 个保守的 III 型效应蛋白进行了功能域预测分析,发现 HopAH1 属于糖基水解酶超级家族。搜索同源蛋白并结合进化树分析发现,HopAH1 与丁香假单胞菌番茄致病变种的效应蛋白亲缘关系较近,而与其他同源蛋白的亲缘关系相对较远。Alpha Fold2 预测三维结构发现,HopAH1 具有糖基水解酶 GH5 家族典型的桶状结构。酶活性测定试验发现 HopAH1 不能水解槐树豆胶、羧甲基纤维素钠以及对硝基苯基- $\beta$ -D 半乳糖苷等 3 种底物,推测可能存在其他特异性底物。使用农杆菌介导的蛋白瞬时表达体系在本氏烟中表达 HopAH1,发现不能引起烟草细胞坏死。研究结果将为 HopAH1 的作用机制研究提供参考。

**关键词:**猕猴桃溃疡病菌;效应蛋白;三维结构;生化功能

**中图分类号:**S436.634.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)12-0121-07

猕猴桃富含维生素 C 等多种营养物质,被誉为“水果之王”,是重要的园艺经济作物<sup>[1]</sup>。猕猴桃溃疡病危害严重,病原为丁香假单胞菌猕猴桃致病变

种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Psa*)<sup>[2]</sup>。猕猴桃溃疡病在我国猕猴桃产区普遍发生,特别是在四川和陕西等猕猴桃主产区,发病率可达 20%,严重影响了我国猕猴桃产量<sup>[3]</sup>。目前针对猕猴桃溃疡病菌发病成灾机制的研究非常少,也加大了对采取有效防治措施的难度。因此,深入研究猕猴桃溃疡病菌的致病机理,对制定猕猴桃溃疡病防治新策略,进而有效地控制病害、提高猕猴桃产量具有重要意义。

植物病原细菌利用 III 型分泌系统将效应蛋白导入寄主细胞,通过影响寄主免疫反应及多种生物

收稿日期:2023-12-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:32202261);江苏省自然科学基金(编号:BK20210156)。

作者简介:张馨怡(1997—),女,陕西咸阳人,硕士研究生,从事植物病理学研究。E-mail:zhangxinyi0302@163.com。

通信作者:郭宝佃,博士,助理研究员,从事植物与病原互作研究, E-mail:guo\_baodian@163.com;刘凤权,博士,教授,从事植物细菌病害研究, E-mail:fqliu20011@sina.com。

[4]管庆林,朴晟源,秦艳青,等. 中微量元素配施对雪茄烟叶中性致香成分及非挥发性有机酸含量的影响[J]. 山东农业科学, 2023,55(2):110-118.

[5]聂新柏,靳志丽. 烤烟中微量元素对烤烟生长及产质量的影响[J]. 中国烟草科学,2003(4):30-34.

[6]刘茜茜. 钙、镁营养对烤烟产量和品质的影响[D]. 贵阳:贵州大学,2020.

[7]吕永华,詹寿,马武军,等. 石灰、钙镁磷肥对烤烟生产及土壤酸度调节的影响[J]. 生态环境,2004,13(3):379-381.

[8]张丽英,许自成,苏永土,等. 烟草钙素营养研究概况[J]. 江西农业学报,2010,22(10):73-75.

[9]王佩云,李璐,陈照峰,等. 钙、镁、铁亏缺对烟草生长和生理指标的影响[J]. 湖南农业科学,2022(10):21-24.

[10]高加明,黄广华,任晓红,等. 氨基酸钙对烤烟生长及烟叶品质

的影响[J]. 现代农业科技,2020(12):23-24,26.

[11]李玥,赖勇林,王军,等. 不同养分缺乏对烤烟根系形态及营养生长的影响[J]. 中国烟草科学,2015,36(2):60-65.

[12]张世川. 中微量元素肥料对抚州烟区烤烟生长发育及产质量的影响[D]. 南昌:江西农业大学,2019.

[13]贾晓红,周再知,马华明,等. 缺素对土沉香幼苗根系生长和叶绿素荧光参数的影响[J]. 热带作物学报,2015,36(4):660-664.

[14]杨兴有,靳冬梅,李爱军,等. 四川万源市烟区生态条件与雪茄烟叶质量分析[J]. 中国烟草学报,2017,23(1):69-76.

[15]介晓磊,刘世亮,李有田,等. 不同浓度钙营养液对烟草矿质营养吸收与积累的影响[J]. 土壤通报,2005,36(4):560-563.

[16]李晓彤,杨婉莹,孙莎莎,等. 外源褪黑素对番茄缺钙胁迫的缓解效应[J]. 植物生理学报,2019,55(2):169-176.

学进程导致寄主感病<sup>[4]</sup>。据报道,在 *Psa* 中至少有 30 个效应蛋白可以通过 III 型分泌系统进入寄主细胞,并且一部分效应蛋白的功能已经被研究<sup>[5]</sup>。比如,效应蛋白 AvrE1 和 HopR1 被发现是 *Psa* 的 2 个重要致病因子,二者缺失后均会严重影响 *Psa* 的致病力<sup>[6]</sup>;效应蛋白 HopZ5 是一个 YopJ 家族的乙酰转移酶,其酶活性是其触发本氏烟和拟南芥上的过敏性坏死反应所必需的<sup>[7]</sup>;张晋龙等通过基因敲除的方法获得了缺失 19 个效应蛋白基因的 *Psa* 突变体  $\Delta$ AFELOM,致病性试验显示突变体  $\Delta$ AFELOM 的致病力完全丧失,表明这 19 个效应蛋白在 *Psa* 致病过程中发挥了重要作用<sup>[8]</sup>;朱俏眉等发现敲除效应蛋白基因 *HopAZ1* 后突变体的致病性显著上升,并进一步鉴定到 HopAZ1 的 2 个互作蛋白 Cp1 和 PR5<sup>[9]</sup>。

编码效应蛋白的基因在植物病原细菌与寄主互作过程中往往受到选择压力而出现变异或缺失等现象<sup>[4]</sup>。在 *Psa* 中有 14 个效应蛋白在猕猴桃溃疡病菌的所有生物型中均存在,包括 AvrD1、AvrE1、AvrPto5、HopAH1、HopAS1、HopAU1、HopAZ1、HopD1、HopN1、HopQ1、HopR1、HopS2、HopY1 和 HopZ3,这种保守性暗示了它们可能在猕猴桃溃疡病菌致病过程中发挥了关键作用<sup>[7]</sup>。然而绝大多数效应蛋白的三维结构与生化功能尚不清楚,目前仅有报道对 AvrE1、HopAZ1 和 HopR1 的功能开展了相关研究。本研究通过生物信息学方法对猕猴桃溃疡病菌的 14 个保守效应蛋白的功能域进行了预测,然后对 HopAH1 的三维结构及其生化功能进行了分析,以期为其致病机理的深入研究提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

猕猴桃溃疡病菌株分离自江苏省南京市六合区红阳猕猴桃园,保存于江苏省农业科学院植物保护研究所植物细菌创新团队。试验于 2023 年 7—11 月在江苏省农业科学院植物保护研究所植物细菌创新团队实验室完成。载体构建所用的菌株为大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ;蛋白原核表达所用的菌株为大肠杆菌 BL21 (DE3),蛋白植物表达所用的菌株为农杆菌 GV3101。诱导细胞坏死试验使用 4~6 周的本氏烟,温室培养条件为 25 °C,光—暗比为 18 h—6 h。

载体构建所用的聚合酶与连接酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;抗生素和蛋白层析

柱、镍珠填充材料以及其他生化试剂(包括异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、乙酰丁香酮、槐树豆胶、羧甲基纤维素钠、对硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖等)均购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白上样缓冲液与蛋白分子量标准均购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 效应蛋白的功能域预测分析

使用 NCBI 的保守功能域数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)搜索 14 个保守效应蛋白的氨基酸序列的保守结构域。

### 1.3 HopAH1 的进化分析

在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/blast>)中利用 BLAST 搜索 HopAH1 的同源蛋白,选取同源性较高的蛋白用于进化树的构建。使用 MEGA 7.0 构建进化树。

### 1.4 HopAH1 的三维结构预测及结构分析

利用 Alpha Fold2(<https://github.com/google-deepmind/alphafold>)预测 HopAH1 的三维结构。通过 Dali 服务器(<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>)在蛋白结构数据库(protein data bank, PDB)中进行同源结构搜索。使用 Pymol 软件对 HopAH1 与其同源蛋白进行结构比对。

### 1.5 基因克隆与表达载体构建

1.5.1 *HopAH1* 基因克隆 以猕猴桃溃疡病菌为模板,扩增 *HopAH1* 基因片段。引物用 BioMX 2.7.1 软件设计(表 1),PCR 条件为 95 °C 5 min;94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 34 个循环;72 °C 8 min。使用 OMEGA Cycle-pure kit 试剂盒按照说明书纯化 PCR 产物得到基因片段 *HopAH1*。

表 1 本研究使用的引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
4T-2-HopAH1-F	GGATCCCCAGGAATTCCTCATGGTCGAGGACGTA
4T-2-HopAH1-R	GGCCGCTCGAGTCGACCCTCAGGAGAATTGATCACC
PB-HopAH1-GFP-F	ATAGCCGGTACCCCATGGTCGAGGACGTA
PB-HopAH1-GFP-R	CTTGCTCACCATCCCGGAGAATTGATCACC

1.5.2 原核表达载体构建 将基因片段 *HopAH1* 与载体 pGEX-4T-2 连接,连接反应体系为:基因片段 3  $\mu$ L,载体 2  $\mu$ L,2  $\times$  Uniclone seamless 5  $\mu$ L, 50 °C 连接 15 min。随后将得到的产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,42 °C 热击 90 s,37 °C 摇床培养 2 h,涂 LB(氨苄青霉素 50  $\mu$ g/mL)平板,取单菌落进行 PCR 验证。将验证正确的菌落用 LB(氨苄青霉素 50  $\mu$ g/mL)液体培养基在 37 °C 摇床中培养,按照天

根生化科技(北京)有限公司的质粒小提中量试剂盒说明书提取质粒后测序验证。

1.5.3 植物表达载体构建 将基因片段 *HopAH1*、*XopN* 与载体 pBIN - GFP 连接,转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂 LB(卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )平板,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h 后,挑选单菌落进行 PCR 验证,将验证正确的单菌落再培养并按照天根生化科技(北京)有限公司的质粒小提中量试剂盒说明书提取质粒后测序验证。

### 1.6 蛋白表达与纯化

将构建好的原核表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,42  $^{\circ}\text{C}$  热击 90 s 后涂 LB(氨苄青霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )平板。挑取单菌落用 LB(氨苄青霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )液体培养基培养至  $D_{600\text{nm}}$  为 0.6 ~ 0.8,然后加入 0.3 mmol/L IPTG 在 20  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 8 ~ 10 h。4  $^{\circ}\text{C}$  5 000 r/min 条件下离心 5 min 收集大肠杆菌菌体,并用提前预冷的 ddH $_2\text{O}$  和 1  $\times$  PBS 分别在上述条件下清洗 1 次并收集菌体。将菌体用 10 mL 1  $\times$  PBS 重新悬浮后用细胞破碎仪 300 W 破碎 30 min,将超声破碎后的菌液用离心机离心 20 min,离心条件为 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 500 r/min,收集上清液。将上清液流过装有谷胱甘肽琼脂糖树脂的亲和层析柱富集 *HopAH1*,用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris - HCl、200 mmol/L NaCl、5 mmol/L 谷胱甘肽)对富集蛋白的琼脂糖珠进行洗脱。洗脱后的含有 *HopAH1* 的蛋白溶液用考马斯亮蓝染色法验证。

### 1.7 农杆菌转化与烟草瞬时表达外源基因

将含有 PB - *HopAH1* - GFP、PB - *XopN* - GFP、PB - GFP 的质粒分别加入农杆菌 GV3101 中混匀,依次于冰上静置 5 min、液氮静置 5 min、37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min、冰浴 5 min。在 28  $^{\circ}\text{C}$  摇床中复苏 2 ~ 3 h,涂 LB(卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、利福平 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )平板并放入 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 2 ~ 3 d。

从 LB 平板上挑取含有 PB - *HopAH1* - GFP、PB - *XopN* - GFP、PB - GFP 的 GV3101 单菌落,用 LB 液体培养基 28  $^{\circ}\text{C}$  培养至  $D_{600\text{nm}}$  为 2.0。将培养好的菌液 5 000 r/min 离心 3 min 收集菌体,用烟草缓冲液(含 10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl $_2$ 、200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  乙酰丁香酮,pH 值为 5.6)清洗 2 次并收集菌体,再用烟草缓冲液重新稀释菌体至  $D_{600\text{nm}}$  为 0.6。将稀释好的农杆菌菌液用无针头的一次性注射器缓慢打入烟草叶片,将注射好的叶片放入 28  $^{\circ}\text{C}$  温室中培养 48 h。

### 1.8 蛋白提取与免疫印迹检测

将培养 48 h 的注射 PB - *HopAH1* - GFP、PB - *XopN* - GFP、PB - GFP 烟草分别收集,用液氮迅速冷冻并用研钵研磨成粉末状,加入含有 1 mL 蛋白裂解液和 10  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂的离心管中,涡旋混匀,4  $^{\circ}\text{C}$ 、20 000 r/min 离心 10 min,将上清液吸出再重复 1 次,放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

将 80  $\mu\text{L}$  蛋白和 20  $\mu\text{L}$  SDS 蛋白上样缓冲液,在 100  $^{\circ}\text{C}$  下反应 5 min,冰上放置 2 min,取 20  $\mu\text{L}$  蛋白用 12% SDS - PAGE 凝胶进行电泳检测,电压 80 ~ 130 V,电泳时间 100 min。电泳结束后将胶取出,从负极开始将海绵、滤纸、胶、PVDF 膜(甲醇浸泡)、滤纸、海绵按照顺序放入夹板,80 V 转膜 3 h。转膜结束后,将膜正面朝上用含有 4% 脱脂奶粉的 TBST(三羟甲基氨基甲烷盐酸盐)封闭 40 min,后用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。加入 GFP 抗体避光孵育 2 h,再用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。用全自动化学发光分析仪观察结果。

### 1.9 $\beta$ - 1,4 - 葡聚糖酶活性检测

将纯化的蛋白 *HopAH1* 与底物 0.5% 槐树豆胶、1% 羧甲基纤维素钠、5 mmol/L 对硝基苯基 -  $\beta$  - D 半乳糖苷进行反应,反应体系 300  $\mu\text{L}$ : 50 mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸钠缓冲液、0.5 mol/L NaCl、底物、15  $\mu\text{L}$  *HopAH1*;37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后加入 300  $\mu\text{L}$  显色剂,100  $^{\circ}\text{C}$  显色 5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 14 个保守 T3SE 的功能域预测分析

用 NCBI 保守功能域数据库对 *Psa* 的 14 个保守 III 型效应蛋白的功能域进行预测,发现有 6 个效应蛋白具有已知的功能域结构,而在另外 8 个效应蛋白中并未发现已知的功能域结构。其中 *HopAH1* 属于糖基水解酶超级家族;*HopAS1* 属于 ATP 酶类超级家族;*HopZ3* 属于 YopJ 类丝氨酸/苏氨酸乙酰转移酶;*HopN1* 属于 C58 肽酶类超级家族;*HopY1* 属于 HrpA\_pilin 超级家族;*HopQ1* 属于核糖苷水解酶超级家族(表 2)。据网址 [https://www.cazy.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Families](https://www.cazy.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Families) 显示,糖基水解酶超级家族(glycosyl hydrolases super family, GHs)拥有 174 个家族(GH1 ~ GH174),包含几丁质酶、纤维素酶、木聚糖酶、木葡聚糖酶等成员。GHs 的不同家族成员具有不同的酶活特性与底物特异性,并且已经发现 GHs 的多个家族成员是病原菌的

表 2 猕猴桃溃疡病菌中 14 个保守效应蛋白功能域预测

效应蛋白	预测保守功能域
HopAZ1	无
AvrPto5	无
HopAH1	糖基水解酶超级家族
HopR1	无
HopAS1	ATP 酶类超级家族
HopZ3	YopJ 类丝氨酸/苏氨酸乙酰转移酶
AvrE1	无
HopN1	C58 肽酶类超级家族
HopS2	无
HopY1	HrpA_pilin 超级家族
HopQ1	核苷水解酶超级家族
HopD1	无
AvrD1	无
HopAU1	无

重要致病因子<sup>[10]</sup>。虽然 HopAH1 属于 GHs,但是其具体功能目前并不清楚;因此,接下来对 HopAH1 的三维结构及生化功能展开研究。

## 2.2 HopAH1 的进化分析

为了分析 HopAH1 的进化关系,首先在 Uniprot 数据库中利用 BLAST 搜索了 HopAH1 的同源蛋白,并从中选取了同源性最高的 23 个蛋白用于进化树的构建。用于分析的 23 个 HopAH1 同源蛋白来源于不同种类微生物,包括多种芽孢杆菌、血杆菌、青枯菌等,且大多数被报道为 GH5 家族的纤维素酶。进化树结果显示,HopAH1 与丁香假单胞菌番茄致病变种的效应蛋白 HopAH1、HopAH2 - 1、HopAH2 - 2 的亲缘关系最近,处在同一个大的进化分支上(图 1)。而 HopAH1 与其他同源蛋白的亲缘关系相对较远(图 1),暗示了它们虽然都属 GHs 家族,但是在功能上可能出现了分化。

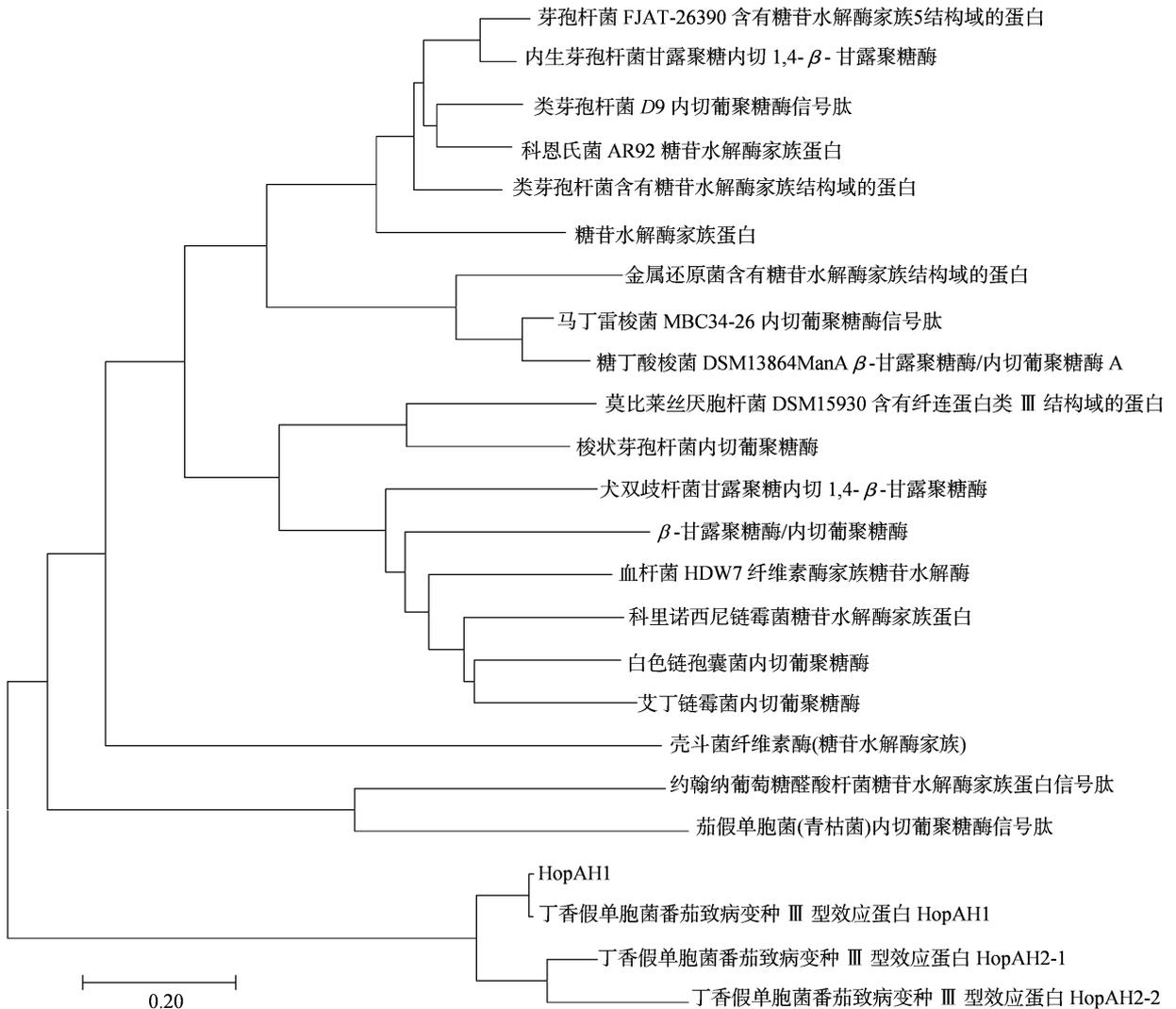


图 1 HopAH1 的系统进化树分析

### 2.3 HopAH1 的三维结构预测及分析

为了分析 HopAH1 的三维结构,利用 Alpha Fold2 对其三维结构进行了预测。HopAH1 的三维结构中包含了 8 个  $\alpha$  螺旋与 8 个  $\beta$  折叠,其中 8 个  $\beta$  折叠组成的桶状结构被 8 个  $\alpha$  螺旋包围在中间(图 2),而这种桶状结构正是 GH5 家族蛋白的典型结构特征。通过分析结构,发现 HopAH1 的 93E 和 194E 很可能是它的酶活催化位点。以 HopAH1 的三维结构为对象,通过蛋白同源结构搜索服务器 Dali 在蛋白结构数据库(PDB)中进行搜索,发现多个与 HopAH1 结构类似的蛋白。选取 Z 分数 > 15.0 (Z 分数越高,表示二者结构越相似)的蛋白结构进行分析,发现大多数蛋白被注释为纤维素酶(表 3)。

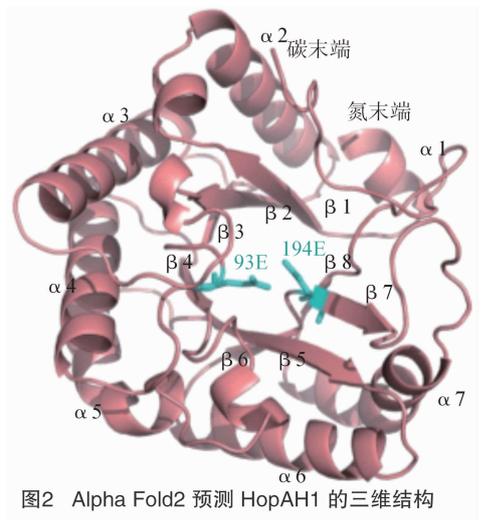


图2 Alpha Fold2 预测 HopAH1 的三维结构

表 3 HopAH1 在 Dali 服务器检索的蛋白数据库(PDB)中的同源结构(Z 分数 > 15.0)

序号	PDB 编号	Z 分数	标准误差	匹配序列长度 (aa)	蛋白序列长度 (aa)	序列相似度 (%)	PDB 描述
1	1wky - A	20.1	2.3	209	446	20	内切- $\beta$ -1,4-甘露醇酶
2	7vt4 - A	18.3	2.5	210	438	15	内切葡聚糖酶
3	6r2j - B	18.2	2.8	214	330	15	内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶
4	4v2x - A	18.1	2.4	214	534	13	内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶
5	6d2w - A	18.0	2.8	223	687	18	芳基磷酸- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶
6	1vjz - A	17.6	2.5	209	325	11	内切葡聚糖酶
7	6jyz - A	17.2	2.6	211	455	17	预测分泌性内切糖脂酶
8	5dvg - A	17.2	2.5	210	450	15	预测分泌性内切糖脂酶
9	5ak1 - A	17.0	2.8	204	842	13	碳水化合物结合家族
10	2zun - B	17.0	2.8	217	379	18	内切 1,4- $\beta$ -葡聚糖酶
11	3zmr - A	16.8	2.7	217	469	17	纤维素酶
12	5a8m - A	16.2	3.0	213	337	15	预测保留型 B-糖苷酶
13	6zb8 - B	16.1	2.9	208	370	14	外切- $\beta$ -1,3-葡聚糖酶
14	6tn6 - A	16.0	2.9	216	465	14	内切-1,4- $\beta$ -甘露糖苷酶
15	8ag9 - A	16.0	3.0	211	335	14	内切葡聚糖苷酶
16	7bob - A	15.5	2.9	210	564	13	内切- $\beta$ -甘露聚糖酶
17	5jvk - A	15.4	3.5	213	490	14	功能未鉴定蛋白
18	1g0c - A	15.3	3.2	216	358	14	内切葡聚糖酶
19	5bx9 - A	15.3	3.4	216	414	13	糖苷水解酶家族
20	8d89 - A	15.1	2.9	202	382	15	糖苷水解酶家族

将 PDB 中结构最相似的 4 个蛋白(PDB 编号分别为 1wky、7vt4、6r2j、4v2x)与 HopAH1 进行结构比对分析,发现它们均表现出桶状结构,并且酶活催化位在结构上的位置也完全一致(图 3)。上述比对结果表明,HopAH1 可能与这 4 个蛋白具有类似的酶活特性与作用底物,其中 1wky 为嗜碱芽孢杆菌产生的碱性甘露聚糖酶;7vt4 为黄山美氏藻产生的 GH5 家族内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶;6r2j 为施氏假单胞菌

A1501 产生的 GH5\_5 家族内切葡聚糖酶;4v2x 为耐盐芽孢杆菌产生的内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶<sup>[11-14]</sup>。

### 2.4 HopAH1 的蛋白表达、纯化及酶活性分析

为了验证 HopAH1 的  $\beta$ -1,4 葡聚糖酶活性,将经过谷胱甘肽琼脂糖树脂纯化的 HopAH1 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并用考马斯亮蓝染色法进行验证,蛋白条带大小约为 55 ku,与 HopAH1 预测大小基本一致(图 4-A)。将纯化后并且分子量

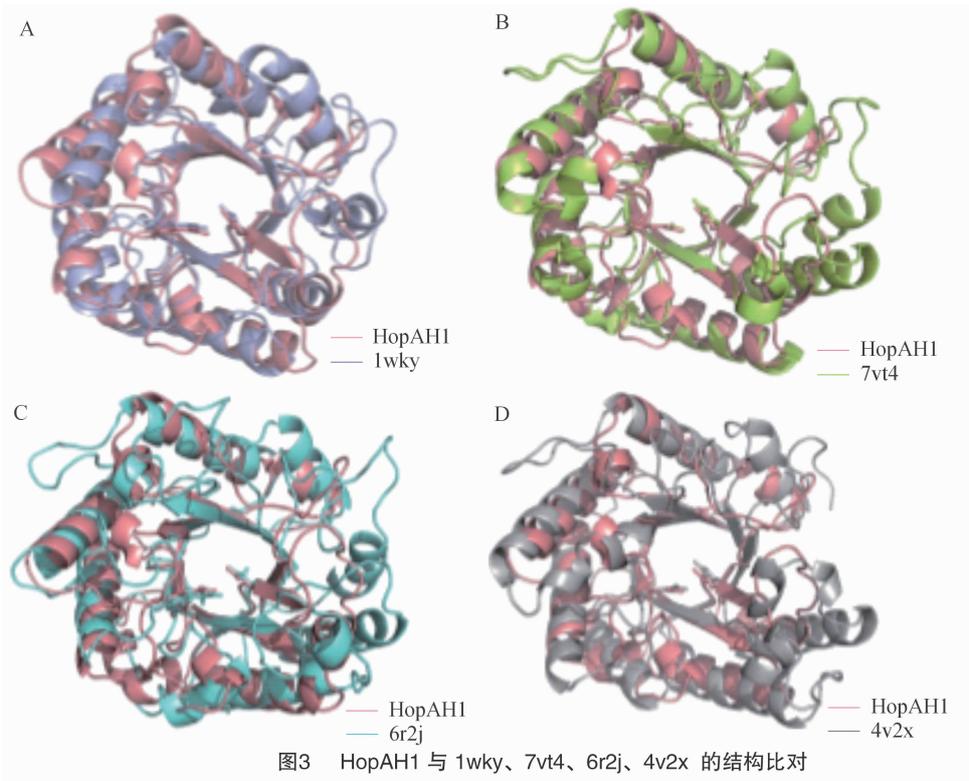


图3 HopAH1 与 1wky、7vt4、6r2j、4v2x 的结构比对

大小正确的 HopAH1 进行  $\beta$ -1,4 葡聚糖酶活性分析,选取了 0.5% 槐树豆胶、1% 羧甲基纤维素钠、5 mmol/L 对硝基苯基- $\beta$ -D 半乳糖苷 3 种底物分

别与 HopAH1 进行反应<sup>[15-16]</sup>。结果表明,与阳性对照相比,上述 3 种底物均没有被 HopAH1 水解(图 4-B)。

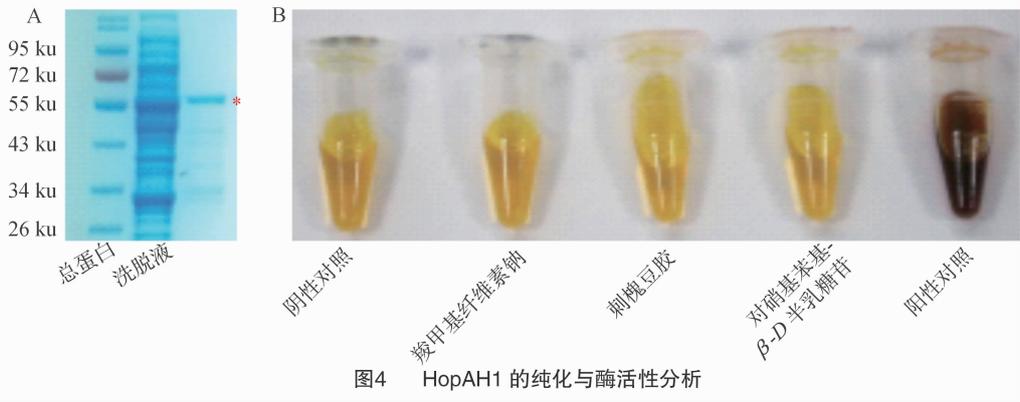


图4 HopAH1 的纯化与酶活性分析

### 2.5 HopAH1 诱导烟草细胞坏死能力分析

为了验证 HopAH1 是否会引起植物的细胞坏死,首先构建了植物表达载体:pBIN-HopAH1-GFP、pBIN-XopN-GFP、pBIN-GFP,并转化至农杆菌 GV3101。以 GFP 作为阴性对照,已知可以引起植物细胞坏死的 XopN-GFP 作为阳性对照<sup>[17]</sup>。将上述农杆菌注射 4~6 周烟草叶片,注射后 48 h 观察结果。结果表明,瞬时表达 HopAH1-GFP 后烟草叶片无明显变化,与阳性对照 XopN-GFP 相比,HopAH1-GFP 没有引起烟草细胞坏死(图 5-A)。免疫印迹检测结果

显示 HopAH1-GFP、XopN-GFP、GFP 在烟草中均已表达(图 5-B)。

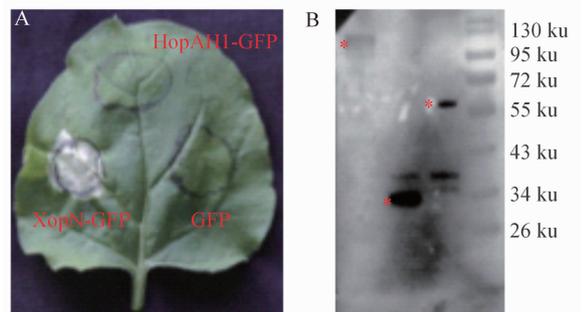


图5 HopAH1 不能诱导本氏烟细胞死亡

### 3 讨论与结论

效应蛋白在调控寄主免疫和细菌致病性中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。探明效应蛋白的三维结构与生化功能,对解析病菌致病性具有重要意义。然而,目前在猕猴桃溃疡病菌中仍有许多效应蛋白的三维结构与生化功能尚不清楚。本研究通过深入分析猕猴桃溃疡病菌中 14 个保守效应蛋白,发现 6 个效应蛋白具有已知的功能域结构,可为后续深入研究效应蛋白的作用与机制提供线索。

本研究发现,HopAH1 属糖基水解酶超级家族,进一步通过 Alpha Fold2 预测发现 HopAH1 的三维结构表现 GH5 家族典型的桶装结构,并且具有保守的酶活催化位点。但是酶活性分析发现 GH5 并不能水解常见的槐树豆胶、羧甲基纤维素钠、对硝基苯基- $\beta$ -D 半乳糖苷等 3 种底物。HopAH1 的进化分析结果表明,其除了与丁香假单胞菌番茄致病变种的效应蛋白亲缘关系较近外,与其他同源蛋白的亲缘关系相对较远。因此,推测 HopAH1 虽然具有 GH5 家族典型的桶装结构,但是很可能具有较强的底物特异性。

糖基水解酶家族成员作为病菌的效应蛋白通常在细胞外发挥功能,并且往往会触发植物的细胞坏死<sup>[10]</sup>。HopAH1 作为效应蛋白被猕猴桃溃疡病菌导入植物细胞内行使功能,这在糖基水解酶家族成员中鲜有报道。在本氏烟中瞬时表达 HopAH1 并不能引起烟草细胞的坏死,表明 HopAH1 与胞外糖基水解酶的作用机制可能存在区别。下一步将鉴定 HopAH1 的作用底物以及互作蛋白,以期解析 HopAH1 的作用机制。

#### 参考文献:

[1]冯勇. 基于主成分和聚类分析的不同品种猕猴桃品质指标综合评价[J]. 江苏农业科学,2021,49(22):180-185.

[2]齐秀娟,郭丹丹,王然,等. 我国猕猴桃产业发展现状及对策建议[J]. 果树学报,2020,37(5):754-763.

[3]田野,李丽丽,杜春梅,等. 猕猴桃溃疡病的研究进展[J]. 江苏农业科学,2023,51(15):8-15.

[4]Xin X F, He S Y. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants[J]. Annu Rev Phytopathol,2013,51:473-498.

[5]McCann H C, Rikkerink E H A, Bertels F, et al. Genomic analysis of

the Kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease [J]. PLoS Pathogens,2013,9(7):e1003503.

[6]Jayaraman J, Yoon M, Applegate E R, et al. AvrE1 and HopR1 from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* are additively required for full virulence on kiwifruit [J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(11):1467-1480.

[7]Jayaraman J, Choi S, Prokchorchik M, et al. A bacterial acetyltransferase triggers immunity in *Arabidopsis thaliana* independent of hypersensitive response[J]. Scientific Reports,2017,7:3557.

[8]张晋龙,赵志博,刘巍,等. 猕猴桃细菌性溃疡病菌 T3SS 关键效应蛋白基因致病功能[J]. 中国农业科学,2022,55(3):503-513.

[9]朱俏眉,赵福,袁金容,等. 猕猴桃溃疡病菌 III 型效应蛋白 HopAZ1 功能研究与互作蛋白鉴定[J]. 植物病理学报,2022,52(1):47-60.

[10]潘凤英,刘露露,孙大运,等. 植物病原菌糖基水解酶基因家族研究进展[J]. 生物学杂志,2022,39(6):94-100.

[11]Akita M, Takeda N, Hirasawa K, et al. Crystallization and preliminary X-ray study of alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate [J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography,2004,60(8):1490-1492.

[12]Ye T J, Huang K F, Ko T P, et al. Synergic action of an inserted carbohydrate-binding module in a glycoside hydrolase family 5 endoglucanase [J]. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology,2022,78(5):633-646.

[13]Dutoit R, Delsaute M, Collet L, et al. Crystal structure determination of *Pseudomonas stutzeri* A1501 endoglucanase Cel5A: the search for a molecular basis for glycosynthesis in GH5\_5 enzymes [J]. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology,2019,75(6):605-615.

[14]Venditto I, Najmudin S, Luis A S, et al. Family 46 carbohydrate-binding modules contribute to the enzymatic hydrolysis of xyloglucan and  $\beta$ -1,3-1,4-glucans through distinct mechanisms [J]. The Journal of Biological Chemistry,2015,290(17):10572-10586.

[15]Zheng F Z, Basit A, Wang J Q, et al. Biochemical analyses of a novel acidophilic GH5  $\beta$ -mannanase from *Trichoderma asperellum* ND-1 and its application in mannooligosaccharides production from galactomannans [J]. Frontiers in Microbiology,2023,14:1191553.

[16]Junghare M, Manavalan T, Fredriksen L, et al. Biochemical and structural characterisation of a family GH5 cellulase from endosymbiont of shipworm *P. megotara* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts,2023,16(1):61.

[17]Li S, Wang Y P, Wang S Z, et al. The type III effector AvrBs2 in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* suppresses rice immunity and promotes disease development [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions,2015,28(8):869-880.