

• 药材与资源 •

广藿香青枯病菌致病相关基因 *RsgidA* 的克隆及生物信息学分析李 巧¹, 王亚琴², 贺 红^{1*}, 张 泳¹, 张宇瑶¹, 黎广卫¹

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 广东 广州 510006

摘要: 目的 对广藿香青枯病菌株 PRS-84 的致病相关基因 *RsgidA* 进行克隆及生物信息学分析。方法 以广藿香青枯病菌 Tn5 转座子插入的低致病力突变株 PRS-84-4-7 为材料, 对广藿香进行致病性实验; 以 Tn5 转座子序列为基础, 对突变株 PRS-84-4-7 的基因组进行反向 PCR 扩增, 克隆转座子插入位点的侧翼序列; 根据序列的同源基因设计特异性引物, 对野生菌株 PRS-84 的基因组进行 PCR 扩增, 对克隆获得的目标基因序列进行生物信息学分析。结果 低致病力突变株 PRS-84-4-7 对广藿香的致病性不明显。成功获得了低致病力突变株转座子插入位点的侧翼序列, 该序列与 *gidA* 基因的相似度最高, 将插入位点基因命名为广藿香青枯病菌 *RsgidA* 基因。从野生菌株 PRS-84 中克隆了致病相关基因 *RsgidA*, 全长 1881 bp, 编码 626 个氨基酸。系统进化分析显示, *RsgidA* 基因编码蛋白与植物病原中丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 的 *GidA* 蛋白亲缘关系较近。结论 从广藿香青枯病菌株 PRS-84 中成功克隆了致病相关基因 *RsgidA*, 为了解青枯病菌的致病机制、研究新的防治广藿香青枯病的方法奠定了基础。

关键词: 广藿香; 青枯菌; *RsgidA* 基因; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-3068-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.024

Cloning and bioinformatics analysis of pathogenicity-related gene *RsgidA* in *Ralstonia solanacearum* isolated from *Pogostemon cablin*

LI Qiao¹, WANG Ya-qin², HE Hong¹, ZHANG Yong¹, ZHANG Yu-yao¹, LI Guang-wei¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To clone the pathogenicity-related gene *RsgidA* in *Ralstonia solanacearum* isolated from Guanghuoxiang (*Pogostemon cablin*, patchouli) and perform bioinformatic analysis. **Methods** The wild-type *R. solanacearum* strain PRS-84 was isolated from patchouli plants infected with bacterial wilt and its Tn5 transposon insertion mutant PRS-84-4-7 attenuated in virulence was constructed and screened in our previous study. Pathogenicity assays of wild-type strain PRS-84 and low virulence mutant PRS-84-4-7 were performed on patchouli plants. The flanking fragment that is adjacent to Tn5 transposon insertion site in mutant PRS-84-4-7 was amplified by inverse PCR. The full-length sequence of the Tn5 transposon insertion-site gene in mutant PRS-84-4-7 was amplified from the genome of wild-type strain PRS-84 by PCR based on primers designed according to the homologous gene sequences, and the nucleotide and protein sequences of the gene were analyzed. **Results** Pathogenicity assays showed that mutant PRS-84-4-7 was significantly less virulent than its wild-type parent strain PRS-84 on patchouli plants. The flanking sequence analysis showed that mutant PRS-84-4-7 had a transposon insertion in a pathogenicity-related gene which was named *RsgidA* due to its high identity to *gidA* gene. *RsgidA* gene in wild-type strain PRS-84 was cloned, with 1881 bp long encoding 626 amino acids. Phylogenetic analysis showed that *RsgidA* protein has the nearest phylogenetic relationship to the *GidA* protein from *Pseudomonas syringae* among different plant pathogen strains. **Conclusion** The pathogenicity-related gene *RsgidA* was cloned successfully from

收稿日期: 2020-08-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81373901); 广东省自然科学基金面上项目 (2019A1515012151)

作者简介: 李 巧, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。E-mail: 2305455396@qq.com

*通信作者: 贺 红, 女, 研究员, 研究方向为中药生物技术。E-mail: hehong67@aliyun.com

R. solanacearum strain PRS-84. This paper might facilitate the study of pathogenicity mechanism of *R. solanacearum* on patchouli and develop new control methods against patchouli bacterial wilt.

Key words: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; *Ralstonia solanacearum*; *RsgidA* gene; cloning; bioinformatics analysis

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物, 以干燥地上部分入药, 其味辛, 性微温, 具有芳香化浊, 和中止呕, 发表解暑等功能, 为广东道地药材、“十大广药”之一。广藿香在种植过程中, 易感染青枯病。青枯病是一种细菌性土传病害, 病原菌在植物维管束内定殖和繁殖, 破坏寄主植物的输导系统, 使植株无法正常吸收水分和养分导致枯萎死亡^[1]。青枯病严重影响广藿香的产量和质量, 危及广藿香的生存和发展。发现和病原菌致病相关基因, 有助于了解病原菌致病机理、开发抗菌的靶标药物及发展新的防病策略。

转座子 (transposon, Tn) 是 DNA 插入因子的一种, 是一类可以在基因组中移动的 DNA 片段^[2]。目前细菌转座子 Tn5 的转座机制已阐明, 利用 Tn5 转座突变技术, 将转座子插入到细菌基因组中, 使得插入位点处基因发生突变并导致其相关功能活性丧失, 从而筛选出功能发生突变的菌株^[3]。如果转座子插入位点基因是病原菌致病相关基因, 就可能导致病原菌致病力丧失或减弱, 由此可发现致病相关基因^[4-5]。本课题组前期从感染了青枯病的广藿香植株中分离得到了青枯菌菌株 *Ralstonia solanacearum* PRS-84^[6], 并利用 Tn5 转座子插入突变及致病性筛选获得了菌株 PRS-84 的低致病力突变株^[7]。本研究以低致病力突变株 PRS-84-4-7 为实验材料, 对其进行致病性验证, 再以插入的 Tn5 转座子序列为基础, 利用反向 PCR 扩增获得转座子插入位点的侧翼序列, 并对插入位点基因进行克隆及生物信息学分析, 为了解广藿香青枯病菌的致病机制、发展新的防病策略奠定基础。

1 材料

广藿香青枯菌野生菌株 *Ralstonia solanacearum* PRS-84 (简称 PRS-84) 由刘丹等^[6]从感染了青枯病的广藿香植株中分离获得。广藿香青枯菌低致病力突变株 PRS-84-4-7 由王亚琴等^[7]构建及筛选获得。

2 方法

2.1 青枯菌的培养

将广藿香青枯菌菌株 PRS-84 及其突变株 PRS-84-4-7 从 -80 °C 取出, 采用划线法将其接种至 NA 固体培养基培养, 挑取单菌落并将其接种于 NA 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 恒温振荡培养 24 h。

2.2 致病性测定

对野生菌株 PRS-84 及低致病力突变株 PRS-84-4-7 进行培养, 将菌液稀释至 5.0×10^8 cfu/mL; 以无菌水为对照, 采用伤根浸泡法, 将稀释后的菌液分别接种至广藿香植株, 再将实验植株移至塑料棚中培养, 湿度 85% 左右, 温度 28~30 °C。观察植株的发病情况。

2.3 反向 PCR 扩增及序列测定

提取低致病力突变株 PRS-84-4-7 基因组 DNA, 用限制性内切酶 *Hind* III 对基因组 DNA 进行酶切, 用 T₄ 连接酶对酶切产物进行连接。根据 Tn5 转座子序列设计的引物 KAN-2 FP-1 (5'-ACC-TACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') 及 KAN-2 RP-1 (5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3'), 对连接产物进行反向 PCR 扩增, 以获得突变株转座子插入位点的侧翼序列。反应体系: 连接产物 1.0 μL; 引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL; Ex Taq 酶 12.5 μL; ddH₂O 9.5 μL。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并对扩增产物进行序列测定。

2.4 *RsgidA* 基因的克隆及序列测定

根据 Tn5 转座子插入位点侧翼序列 BLAST 比对获得的同源基因序列设计特异性引物: 4-7-F 为 CCCTCGAGTGTTCCGTCTTTTTTCTGGT (下划线为 *Xho* I 酶切位点), 4-7-R: CGAGCTCTG-ATGCTTAGGAAAATTCCAGATA (下划线为 *Sac* I 酶切位点)。分别以野生菌株及突变菌株基因组 DNA 为模板, 以 4-7-F 及 4-7-R 为引物对目的基因进行 PCR 扩增。反应体系: 高保真预混合酶 45 μL; 引物 (10 μmol/L) 各 2.0 μL; DNA 模板 1.0 μL。反应条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 3 min。

取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪观察, 并对扩增产物进行切胶回收。将纯化产物与 T 载体 (pClone007 simple vector) 连接, 构建重组质粒, 采用热激法将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞, 将转化后的菌液涂布于含有氨苄青霉素 (100 μg/mL) 的 LB 固体培养基, 过夜培养。

挑取抗性菌落, 进行 PCR 鉴定, 进一步提取阳性克隆质粒并经 *Xho* I 及 *Sac* I 双酶切鉴定和测序。

2.5 生物信息学分析

将测序获得的核苷酸序列通过 ExPASy 工具翻译成氨基酸序列; 以 ProtParam 在线工具对蛋白质进行理化性质预测; 以 ProtScale 软件对蛋白质进行亲疏水性预测; 以 SignalP 5.0 软件对蛋白质进行信号肽预测; 以 TMHMM 软件对蛋白质进行跨膜结构预测; 以 SOPMA 软件对蛋白质进行二级结构预测; 以 SWISS-MODEL 对蛋白质进行三级结构预测; 使用 NCBI 中的 BLAST 工具搜索并下载其他植物病原中的同源氨基酸序列, 利用 MEGA5.1 软件中的邻接法构建系统进化树。

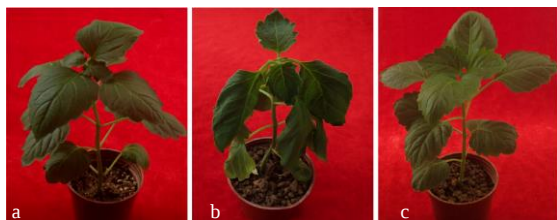
3 结果与分析

3.1 低致病力突变菌株对广藿香的致病性表型

分别用野生菌株 PRS-84 及突变株 PRS-84-4-7 对广藿香植株进行伤根浸泡处理, 以用无菌水浸泡的植株为对照, 观察植株在 7 d 内的发病情况。图 1 为接种第 3 天的植株表型, 可以看出, 无菌水处理的植株保持健康, 接种野生菌株 PRS-84 的广藿香植株出现叶片下垂、萎蔫等典型的青枯病症状, 而接种突变株 PRS-84-4-7 的植株无明显的发病症状。结果表明, 与野生菌株 PRS-84 相比, 突变株 PRS-84-4-7 的致病性明显减弱, 符合低致病力突变株的表型特征。

3.2 低致病力突变株 Tn5 转座子插入位点侧翼序列的扩增及序列测定

根据 Tn5 转座子序列设计的特异性引物对突变株 PRS-84-4-7 基因组 DNA 进行反向 PCR 扩增, 电泳结果显示 (图 2), 该菌株扩增出特异性



a-无菌水处理的植株 b-接种野生株 PRS-84 的植株 c-接种突变株 PRS-84-4-7 的植株

a-plant treated with sterile water b-plant inoculated with wild-type strain PRS-84 c-plant inoculated with mutant PRS-84-4-7

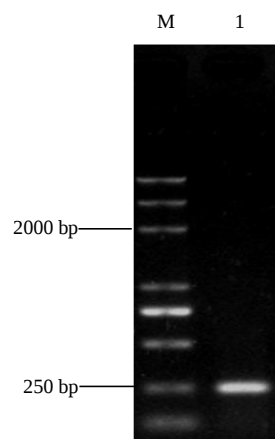
图 1 低致病力突变菌株与野生菌株对广藿香的致病性表型 (接种第 3 天)

Fig. 1 Pathogenicity assays of low virulent mutant and wild-type strain on patchouli plants (at 3rd day post-inoculation)

条带, 说明 Tn5 转座子成功插入至广藿香青枯菌 PRS-84 的基因组中。对 Tn5 转座子插入位点侧翼序列进行测序及分析, 结果显示, 转座子插入位点基因与 *gidA* (glucose-inhibited division protein A) 基因 (Genbank accession No. CP049363.1) 的相似度最高, 将该基因命名为广藿香青枯病菌 *RsgidA* 基因。

3.3 广藿香青枯病菌 *RsgidA* 基因的克隆

根据 Tn5 转座子插入位点侧翼序列 BLAST 比对获得的同源基因序列设计特异性引物 4-7-F/4-7-R, 以野生菌株 PRS-84 和突变株 PRS-84-4-7 基因组 DNA 为模板, 对插入突变基因进行 PCR 扩增, 电泳结果显示 (图 3), 突变株扩增的条带约

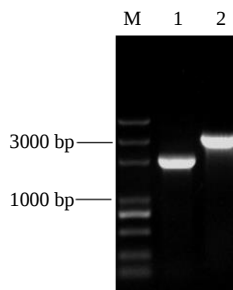


M-Marker 1-突变株 PRS-84-4-7

M-Marker 1-mutant strain PRS-84-4-7

图 2 低致病力突变株 Tn5 转座子插入位点侧翼序列的反向 PCR 检测

Fig. 2 Gel electrophoresis of inverse PCR products of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion site in low virulent mutant



M-Marker 1-野生菌株 PRS-84 2-突变株 PRS-84-4-7

M-Marker 1-wild-type strain PRS-84 2-mutant strain PRS-84-4-7

图 3 低致病力突变株 Tn5 转座子插入突变基因的 PCR 检测

Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR products of Tn5 transposon insertion-site gene in low virulent mutant PRS-84-4-7

为 3000 bp, 较野生菌株长 1000 bp 左右, 因 Tn5 转座子全长为 1221 bp, 与预期片段大小一致。将菌株 PRS-84 的 PCR 扩增产物进行切胶纯化回收, 将其与 T 载体连接后转化至大肠杆菌感受态细胞, 经菌落 PCR 及双酶切鉴定获得阳性克隆子, 表明成功克隆了广藿香青枯病菌 *RsgidA* 基因。

3.4 广藿香青枯病菌 *RsgidA* 基因的生物信息学分析

3.4.1 *RsgidA* 基因的序列分析 对“3.3”项中获得的阳性克隆子进行培养, 提取质粒, 测序获得 *RsgidA* 基因的全长序列。该基因全长从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA 为 1881 bp, 共编码 626 个氨基酸 (图 4)。

```

1 CCCTCGAGTGTTCGGTCTTTTTTCTGGTGTGTTTGTACTCATGCACTATCCTAAAGTTTATGATGTTATCGTTATCGGTGGC
1 M H Y P K V Y D V I V I G G
85 GGTCACGCAGGTACGGAAGCGCGCTTGCTGCTGCGCTATGGGACGACAGACTTTGCTTTTGACCCATAACATTGAGACTTTG
15 G H A G T E A A L A A A R M G R Q T L L L T H N I E T L
169 GGTCAGATGAGCTGAACCCAGCAATTGGTGGCATTGGTAAGTCGCACTTAGTTCGTGAAATTGATGCGCTTGGCGGTGCAATG
43 G Q M S C N P A I G G I G K S H L V R E I D A L G G A M
253 GCTTTAGCTGCCGATAAAGGCGGCATTCAATTCCGTATTTAACTCGCGTAAAGGTGCAGCAGTACGTGCAACGCGTGCTCAG
71 A L A A D K G G I Q F R I L N S R K G A A V R A T R A Q
337 GCTGACCGTGTTCGTATAAAGTGCAGTTCGTGAGACCTTAGAAAAACAAGCAAATCTTGATATTTTCAACAGGCGGCTGAT
99 A D R F V R Y K A A I R E G L E K S S G G R A G D P P S I A
421 GACCTGATTGTTGAAGGCGATACTGTTAAAGGTGTGTGACCCAAATGGGTATCCGCTTTGATGCAAAAACTGTTGTGTTAACT
127 D L I V E G D T V K G V V T Q M G I R F D A K T V V L T
505 ACTGGTACATCTTGGGCGGTGTTATTCACGTTGGTTTAGAGAAATCAAGCGGCGGTGCTGCTGGTGATCCTCTCTATTGCT
155 T G F T F L G G V I H V G L E K S S G G R A G D P P S I A
589 CTTGCTCAGCGTCTTCGTGAGTTGAAATTACCGGTAGGCGGTTTAAAAACAGGTACACCTCCACGTATTGATGCACGTTCACTT
183 L A Q R L R E L K L P V G R L K T G T P P R I D A R S V
673 GATTTTTCTGTTATGACACCACAACAGGCGACTTCCCGTCTCCGGTAATGTCGTTTATGGTGATGTGCTATGCACCCAGAA
211 D F S V M T P Q P G D F P S P V M S F M G D V S M H P E
757 CAAGTGAAGTCTATATCAGCATACTAACGAAAAAATCATGACATTATTCGTGGTGGCTTAGACCGTTACCAATGTATACC
239 Q V N C Y I T H T N E K T H D I I R G G L D R S P M Y T
841 GGTGTCATTGAAGGGTAGGTCCACGTTACTGCTCTCAATTGAAGATAAGATTTCATCGTTTCTGTGATAAGACTCGCATCAG
267 G V I E G V G P R Y C P S I E D K I H R F S D K H P Q
925 GTATTCTTAGAGCCAGAAGGCCTTGATACACATGAGCTTTATCCAAATGGTATTTGCACTTCATTACCATTGATGTTCACTTT
295 V F L E P E G L D T H E L Y P N G I S T S L P F D V Q F
1009 GAAGTCGTGCGCTGATTCGCGGTATGGAATGCCATATCTTACGTCCGGGTTATGCAATCGAATCGAATGACTATTTTAAACCGG
323 E L V R S I R G M E N A H I L R P G Y A I E Y D Y F N P
1093 CAAGCTTGAAATTTACCTAGAAACCAAGCAATTAACGGTTTGTATTTTGCAGGCAAAATTAATGGTACTACCGGTTATGAA
351 Q A L K F T L E T K A I N G L Y F A G Q I N G T T G Y E
1177 GAAGCGGTGCGCAAGGTTTACTTGACGGCTTGAACGCTGCACGCCGTGCATGGGAACAAGAAGATGGACACCTAAACGTGAC
379 E A G A Q G L L A G L N A A R R A W E Q E E W T P K R D
1261 CAAGCTTATATGGGTGATTGTTGACGACTTGATTACCCTAGGTACGAAAGAGCCATACCGTATGTTCACTTCACGTGCGGAA
407 Q A Y M G V L V D D L I T L G T K E P Y R M F T S R A E
1345 TATCGTTTGATGTTACGTGAAGATAATGCCGATCAACGTTTAAACAATGTTAGTGGGATGACTTGGTTGTTGATGATGTTTCGT
435 Y R L M L R E D N A D Q R L T T I G R E L G L V D D V R
1429 TGGCAGCTTATTGCGAAAAATGGAAGCTGTTAGCGCGAAACATCTCGTTTACAACATTTATGGGCGGCACCAACAACCCA
463 W A A Y C E K M E A V E R E T S R L Q H L W A A P N N P
1513 ATGGGTAAAAAGTTTGTGAAATGACAGGTGCTGACTTAAGTAAAGAATGATGCGGATTGACTTGCTTAAACGTCCTAATATT
491 M G K K F V E M T G A D L S K E C S A I D L L K R P N I
1597 AATTTTGGCCAAATTTGCGGAACCTACAGGTTCTGAAGTATCACAGCAAGTCGGTGAGCAATTTGAAATTTGCTGTTAAATATGAA
519 N F G Q I A E L T G S E V S Q Q V G E Q I E I A V K Y G
1681 GGTTATATCAACCGTCAGCATGAAGATGTGGCTCAATTAACACGCTTGAAGAACTAAATTCCTGCTGATTTTGATTATGAC
547 G Y I N R Q H E D V A Q L K R L E E T K I P A D F D Y D
1765 GTCGTTTCAGGTTTATCTCGCAAAATTACTCAGAAGTTGAAACAGTTCGCCCGGAAACATTAGTCAAGCGAGCCGTATTCCT
575 V V S G L S R E I T Q K L K T V R P E T L A Q A S R I P
1849 GGTGTTACCCAGCTGCTGTTACGCTTGTAAATGATCAGGATTCGTAATAATATGACGAAAAAACGGCTTAATTTATTTAAAG
603 G V T P A A V Q L V M I T I R K N N M T K K T A *
1933 CGTGTAATAAAGCCCGTTAAGACTGGGCTTTTTTATTCTGTATCAAAAAATATCTGGAATTTTCTAAGCATCAGAGCTCG

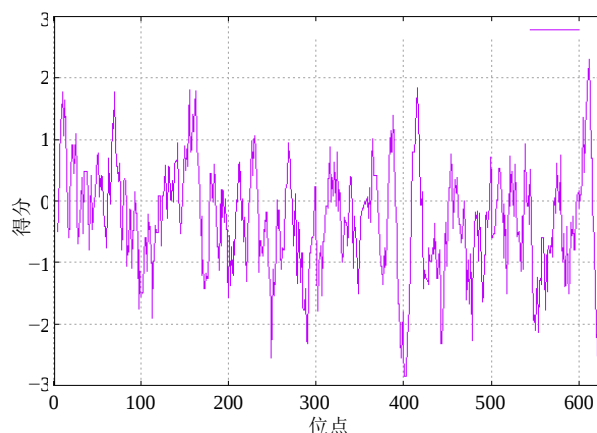
```

图 4 *RsgidA* 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of gene *RsgidA*

3.4.2 *RsGidA* 蛋白的理化性质及结构预测 利用 ProtParam 软件对 *RsgidA* 基因的编码蛋白进行理化性质预测。*RsGidA* 蛋白相对分子质量为 69 071.73, 理论等电点为 6.21, 分子式为 $C_{3038}H_{4863}N_{867}O_{923}S_{24}$, 脂肪系数为 86.04, 不稳定指数为 38.76, 亲水性平均系数为 -0.319。利用 ProtScale 软件对 *RsGidA* 蛋白进行亲疏水性预

测, 由图 5 可看出, 该蛋白亲水性氨基酸数量多于疏水性氨基酸, 预测为亲水性蛋白。利用 SignalP 5.0 及 TMHMM 软件分别对 *RsGidA* 蛋白进行信号肽及跨膜结果预测, 结果显示该蛋白不含信号肽, 无跨膜区。利用 SOPMA 软件进行蛋白质的二级结构预测, 结果显示, *RsGidA* 蛋白二级结构中包含 256 个 α 螺旋, 216 个无规卷曲, 98 个



横坐标表示氨基酸位置, 纵坐标表示亲疏水性得分 (正值表示疏水性, 负值表示亲水性)

Amino acid position is showed on the abscissa, the hydrophobicity score is on the ordinate (positive values indicate hydrophobicity and negative values indicate hydrophilicity)

图 5 RsGidA 蛋白的疏水性分析

Fig. 5 Hydrophobicity analysis of RsGidA protein

延伸链, 56 个 β -转角, 分别占氨基酸总数的 40.89%、34.5%、15.65% 和 8.95%。以大肠杆菌 GidA 的晶体结构 (PDB ID: 3ces) 为模板, 利用 SWISS-MODEL 软件对 RsGidA 蛋白的三级结构进行预测, 其空间结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲组成, 与二级结构预测结果相符合 (图 6)。

3.4.3 RsGidA 蛋白与不同植物病原细菌同源氨

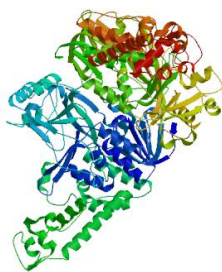


图 6 RsGidA 蛋白的三级结构预测

Fig. 6 Prediction of tertiary structure of RsGidA protein

基酸的系统进化分析 一般认为氨基酸序列相似性大于 30% 的蛋白质可能由同一种蛋白分化而来, 为同源蛋白, 可能具有相似的结构和功能^[8]。RsGidA 蛋白与不同植物病原菌中的 GidA 氨基酸序列进行比对及系统进化分析, blastp 结果显示, RsGidA 与丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae*、菠萝泛菌 *Pantoea ananatis*、生癌肠杆菌 *Enterobacter cancerogenus*、西瓜食酸菌 *Acidovorax citrulli* 及野油菜黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 的同源氨基酸序列相似性分别为 71.36%、66.77%、66.03%、64.45% 及 64.68%。采用 MEGA 5.1 软件的邻接法构建系统发育树, 表明 RsGidA 蛋白与其他植物病原细菌同源蛋白的关系与 blastp 比对结果一致 (图 7), 其中, RsGidA 蛋白与丁香假单胞菌的 GidA 蛋白亲缘关系最近。

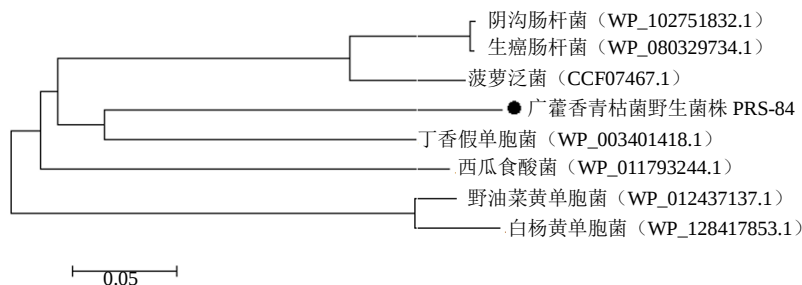


图 7 RsGidA 蛋白与不同植物病原细菌同源氨基酸的系统进化分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of RsGidA protein and homologous proteins from different plant pathogen strains

4 讨论

GidA 蛋白又名 MnmG^[9] (tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG), 在原核及真核细胞中广泛存在且高度保守^[10-11], 其介导的 tRNA 修饰对于蛋白质的准确翻译具有重要作用^[12], 该蛋白的缺失或者突变会引起基因表达功能紊乱, 导致细胞正常生命活动异常。von Meyenburg 等^[13]对大肠埃希菌进行了 Tn10 转座子插入突变, 获得了在含有葡萄糖培养基中细胞形态改变的突变株, 研究表明该突变株的转座子插入了 1 个功能基因, 该基因在葡萄糖的作用下可以使细胞的分裂受到抑制 (glucose-inhibited division), 因此将该基因命名为 *gidA*。Shippy 等^[14-15]对沙门氏菌的 *gidA* 基因进行缺失突变后, 细胞形态呈丝状改变, 还发现突变株的染色体分裂受阻, 与细胞分裂相关的基因表达异常。

最近的研究表明, *gidA* 基因还与病原菌的致病性相关。Kinscherf 等^[16]通过 Tn5 转座子插入突变获得了丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 的毒性突变菌株, 该突变株的脂肽毒素分泌能力及运动性消失, 毒性减弱, 研究发现突变株的转座子插入位点位于 *gidA* 基因的开放阅读框内, 表明 *gidA* 基因对丁香假单胞菌的毒性具有调控作用。Gupta 等^[17]构建了铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的转座子插入突变体库, 并筛选得到多个减毒株, 其中 *gidA* 基因的失活对 LasA 蛋白酶和绿脓菌素等毒力因子的合成具有显著影响。此外, 张伟等^[18]以生防菌荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 为研究对象, 通过 Tn5 转座子插入突变的方法获得 *gidA* 基因突变的菌株, 该突变株生物膜形成能力及对小麦根部的定殖能力均较野生菌株显著降低。

在细菌分类鉴定中, 假单胞菌属 *Pseudomonas* 曾是一个大属, 劳尔氏菌属细菌 *Ralstonia* 曾隶属于假单胞菌属, 而青枯劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* (简称青枯菌) 最早也被命名为青枯假单胞菌 *Pseudomonas solanacearum*, 表明青枯菌与假单胞菌有较大的关联。本研究成功从广藿香青枯菌菌株 *R. solanacearum* PRS-84 中克隆了 *RsgidA* 基因, 系统进化分析表明, 该基因与丁香假单胞菌 *P. syringae* 的 *gidA* 基因具有较近的亲缘关系。

有研究表明, 细菌的运动性和生物膜形成能力与病原菌的致病力相关。病原菌的运动性在其侵染寄主植物的过程中具有重要作用^[19-20], 运动性功能

缺陷可导致病原菌致病性的减弱^[21]。植物病原细菌的生物膜的形成有利于病原菌在寄主植物中定殖, 一些植物病原细菌的生物膜可在寄主植物的木质部中形成, 导致导管堵塞, 从而使植株出现萎蔫失水等症状^[22-23]。本实验室前期对低致病力突变株 PRS-84-4-7 的运动性及生物膜形成能力进行了研究, 结果显示, 与野生菌株 PRS-84 相比, 突变株 PRS-84-4-7 的运动性降低, 生物膜形成减少 (未发表数据), 推测 *RsgidA* 基因可能通过调控青枯菌的运动性和生物膜形成, 从而在青枯菌侵染广藿香及其在体内定殖过程中发挥作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lowe-Power T M, Khokhani D, Allen C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(11): 929-942.
- [2] Choi K H, Kim K J. Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(3): 217-228.
- [3] 年洪娟, 陈丽梅, 李昆志. Tn5 转座突变技术在革兰氏阴性细菌分子遗传研究中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(12): 114-118.
- [4] Luo J Y, Qiu W, Chen L, et al. Identification of pathogenicity-related genes in biofilm-defective *Acidovorax citrulli* by transposon Tn5 mutagenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28050-28062.
- [5] Song X, Guo J, Ma W X, et al. Identification of seven novel virulence genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by Tn5-based random mutagenesis [J]. *J Microbiol*, 2015, 53(5): 330-336.
- [6] 刘丹, 贺红, 黄海波, 等. 广藿香青枯病菌的分离培养及致病性测定 [J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1596-1599.
- [7] Wang Y Q, Zhang Y Y, Jin H, et al. A practical random mutagenesis system for *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of *Pogostemon cablin* using Tn5 transposon [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 35(1): 7.
- [8] 靳利霞, 唐焕文. 蛋白质结构预测方法简述 [J]. *自然杂志*, 2001, 23(4): 217-221.
- [9] Shippy D C, Fadl A A. tRNA modification enzymes GidA and MnmE: Potential role in virulence of bacterial pathogens [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18267-18280.
- [10] Meyer S, Scrima A, Versées W, et al. Crystal structures of the conserved tRNA-modifying enzyme GidA: Implications for its interaction with MnmE and substrate [J]. *J Mol Biol*, 2008, 380(3): 532-547.

- [11] Yu H, Kim K S. mRNA context dependent regulation of cytotoxic necrotizing factor 1 translation by GidA, a tRNA modification enzyme in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 2012, 491(2): 116-122.
- [12] Moukadiri I, Prado S, Piera J, et al. Evolutionarily conserved proteins MnmE and GidA catalyze the formation of two methyluridine derivatives at tRNA wobble positions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(21): 7177-7193.
- [13] von Meyenburg K, Jørgensen B B, Nielsen J, et al. Promoters of the atp operon coding for the membrane-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Tn10 insertion mutations [J]. *Mol Gen Genet*, 1982, 188(2): 240-248.
- [14] Shippy D C, Eakley N M, Bochsler P N, et al. Biological and virulence characteristics of *Salmonella enterica* serovar typhimurium following deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene [J]. *Microb Pathog*, 2011, 50(6): 303-313.
- [15] Shippy D C, Heintz J A, Albrecht R M, et al. Deletion of glucose-inhibited division (*gidA*) gene alters the morphological and replication characteristics of *Salmonella enterica* Serovar typhimurium [J]. *Arch Microbiol*, 2012, 194(6): 405-412.
- [16] Kinscherf T G, Willis D K. Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae* [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(8): 2281-2286.
- [17] Gupta R, Gobble T R, Schuster M. GidA posttranscriptionally regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(18): 5785-5792.
- [18] 张伟, 张博, 吴小刚, 等. 荧光假单胞菌 2P24 中 *gidA* 基因对 PcoI/PcoR 群体感应系统的影响 [J]. *微生物学通报*, 2014, 41(2): 258-266.
- [19] Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria [J]. *Int J Med Microbiol*, 2002, 291(8): 605-614.
- [20] Tans-Kersten J, Huang H, Allen C. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(12): 3597-3605.
- [21] Meng F H, Yao J, Allen C. A MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence [J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(10): 2477-2486.
- [22] Mori L, Inoue K, Ikeda K, et al. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces [J]. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17(6): 890-902.
- [23] Castiblanco L F, Sundin G W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria [J]. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58(4): 362-372.

[责任编辑 时圣明]