

黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C 中 VI 型分泌蛋白的生物信息学分析

韩长志¹ 王娟²

1.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,昆明 650224;

2.云南省林业科学院/国家林业局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室/
云南省森林植物培育与开发利用重点实验室,昆明 650201

摘要 为明确黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C(*Xcr*)中存在的 VI 型分泌蛋白(Tss)数量及其所具有的信号肽、保守 motif 等信息以及该菌中 Tss 与其他病菌中同源序列之间的遗传关系,利用关键词对 *Xcr* 蛋白质数据库进行搜索,并对 *Xcr* 中 Tss 氨基酸序列开展信号肽、跨膜结构域以及保守基序(motif)的生物信息学分析,同时对 *Xcr* 中所含有的 Tss 与其他病原菌中同源序列之间的遗传关系进行分析。明确 *Xcr* 中存在 3 个 Tss,分别命名为 TssA、TssB、TssC,上述 Tss 均含有高于 50% 比例的 α 螺旋结构,均定位在细胞膜上以及具有 3 个保守 motif,而就信号肽而言,仅 TssC 含有明显的信号肽序列。*Xcr* 中的 Tss 与 *Xcc*、*Xca* 等黄单胞菌属病菌中的 Tss 具有较近的亲缘关系。

关键词 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C; VI 型分泌系统; VI 型分泌蛋白; 黄单胞菌属

中图分类号 S 763 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0042-07

病原细菌与植物相互作用过程中,病原细菌为了有效地侵染植物,可通过分泌系统将分泌蛋白输入到寄主组织中,这些分泌蛋白作为效应分子具有操控植物防卫反应的功能^[1]。

目前,在细菌中已经发现有 7 种分泌系统,包括 I 型分泌系统(type I secretion system, T1SS)到 VII 型分泌系统(type VII secretion system, T7SS)^[2]。不同学者对植物细菌 T1SS^[3]、II 型分泌系统^[4-5]、耶尔森菌(*Yersinia*)^[6]、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[7]、志贺菌(*Shigella*)^[8]的 III 型分泌系统^[9-10],以及对 IV 型分泌系统^[11]、V 型分泌系统^[12]从其结构、功能、调控等方面进行了大量研究。VI 型分泌系统(Type VI secretion system, T6SS)是 2006 年在人类致病细菌——霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中发现的一种新的分泌系统^[13-14],广泛存在于革兰氏阴性细菌中^[15]。国内外学者从分泌系统结构、生物学功能与调控^[15]等方面对植物细菌 T6SS 进行了大量研究^[16-17],已经初步明确植物青枯菌(*Ral-*

stonia solanacearum)^[18]、伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Typhi)^[19]等革兰氏阴性细菌 T6SS 基因的功能。根据 T6SS 各组分所具有的功能,可将其分为四大类蛋白(结构蛋白、转位蛋白、分泌蛋白以及辅助蛋白等^[2]),然而对于上述分泌蛋白在致病方面所发挥的作用尚不清楚。同样,对于可以引起茄科蔬菜和十字花科蔬菜叶斑病、给全世界的经济产生重大损失的黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C, *Xcr*)T6SS 蛋白功能的研究也鲜有报道^[20]。

本研究通过对已完成基因组测序和蛋白功能注释的 *Xcr* 进行 VI 型分泌蛋白(type six secretion protein, Tss)的搜索,明确 Tss 数量,同时,就 Tss 的保守结构域、理化性质、保守基序,以及其他植物病原菌同源序列之间的遗传关系等开展生物信息学分析,以期为进一步开展黄单胞菌属中核桃细菌性黑斑病菌中 Tss 的研究提供理论参考。

收稿日期: 2015-09-13

基金项目: 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室/国家林业局云南珍稀濒危植物保护和繁育重点实验室开放基金项目(2016-05); 国家自然科学基金项目(31200488, 31560211); 云南省科技计划项目(2015IA005); 云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金项目(ZK150004); 云南省教育厅科学研究基金项目(2014Y330)

韩长志, 博士, 讲师。研究方向: 经济林木病害生物防治与真菌分子生物学。E-mail: hanchangzhi2010@163.com

通信作者: 王娟, 博士, 教授。研究方向: 生物多样性、植物生态学和分子生物学。E-mail: schima@163.com

1 材料与方法

1.1 蛋白序列来源

在 *Xcr* 全基因组数据库中,通过输入“Type VI secretion protein”、“T6SS”等关键词获取 Tss。

1.2 方法

1) Tss 中保守结构域分析。通过 SMART 网站,对 *Xcr* 中 Tss 具有的保守结构域进行预测分析^[21]。

2) Tss 的疏(亲)水性、理化性质预测。利用 Protscale 程序,对 *Xcr* 中所含 Tss 进行亲水性、疏水性以及等电点、分子量等进行预测^[21]。

3) Tss 的转运肽、信号肽预测。利用 TargetP 1.1 预测蛋白质转运肽情况;利用 SignalP 4.1 Server,进行氨基酸信号肽的预测^[21]。

4) Tss 的高级结构、跨膜区结构分析。通过 PHD 网站,对 *Xcr* 中所含 Tss 二级结构、三级结构等蛋白高级结构进行预测分析。通过 TMHMM 网

站,对 *Xcr* 中所含 Tss 的跨膜结构域进行预测^[21]。

5) Tss 的亚细胞定位预测。通过 ProtCompB 网站,对 *Xcr* 中 Tss 开展亚细胞定位预测^[21]。

6) Tss 的保守 motif 分析。利用 MEME^[22],对 *Xcr* 中所含 Tss 进行保守 motif 分析。

7) 遗传关系分析。利用 ClustalX^[21]、MEGA6.0^[23]等对 *Xcr* 中所含 Tss 的遗传关系进行分析。

2 结果与分析

2.1 *Xcr* 中 3 个 Tss 均具有跨膜结构域

通过对 *Xcr* 蛋白质数据库进行关键词搜索,获得了 3 条蛋白序列,其登录号分别为 WP_043921523、WP_043922167、WP_014508186(表 1);同时,利用 SMART 在线分析,结果显示,上述 3 条序列均具有跨膜结构域,数量分别为 1、5、3 个(图 1)。根据上述 3 条序列所含氨基酸的大小进行排序,分别将其命名为 TssA、TssB、TssC(表 1)。

表 1 黄单胞菌 3 个 VI 型分泌蛋白的基本信息

Table 1 The information of three type VI secretion proteins in *Xcr*

分泌蛋白名称 Name of secretion proteins	获取方法 Access method	Accession ID	氨基酸长度/aa AA length
TssA	关键词搜索 Keywords search	WP_043921523	563
TssB	关键词搜索 Keywords search	WP_043922167	377
TssC	关键词搜索 Keywords search	WP_014508186	129

此外,通过 TMHMM Server v. 2.0 以及 SMART 预测分析,发现 TssA、TssB、TssC 均含有数量不等(1~5 个)的跨膜结构域(图 1),即 TssA 在 N 端具有 1 个典型跨膜区,位置为 12~34;TssB 则具有 5 个跨膜区,位置分别为 49~71、83~105、186~208、220~242、277~299;TssC 含有 3 个跨膜区,位置分别为 20~42、57~76、88~110(图 2)。

75 位的脯氨酸(P)亲水性最弱,预测数值为 2.226(表 2);TssB 中位于 340 位的苏氨酸(T),其亲水性最强,为 -1.353,而位于 201 位的 G,其亲水性最弱,

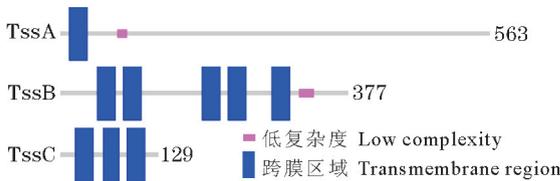


图 1 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白具有的保守结构域

Fig.1 The conserved domain of three type VI secretion proteins in *Xcr*

2.2 Tss 的疏(亲)水性及理化性质

结果表明,*Xcr* 中 3 个 Tss 在疏(亲)水性位点及数值方面均存在差异,其中,TssA 中 494 位的甘氨酸(G)亲水性最强,预测数值为 -1.937,而处于

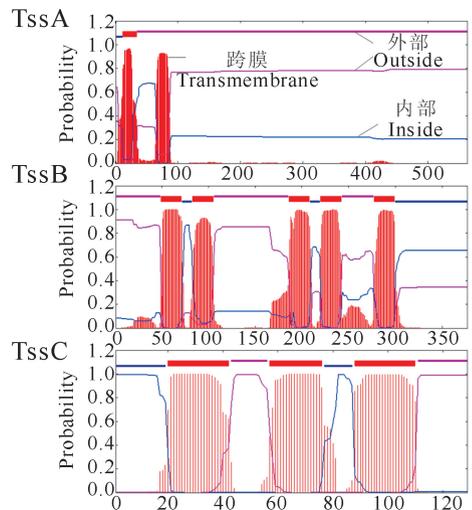


图 2 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白具有的跨膜结构域

Fig.2 The transmembrane domain of three type VI secretion proteins in *Xcr*

表 2 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白亲水性和疏水性情况

Table 2 The hydrophobic and hydrophilic amino acid residue situation of Tss in Xcr

项目 Item	TssA	TssB	TssC
疏水性最强的氨基酸残基 Most hydrophobic amino acid residue	P	G	I
所处位置 Position	75	201	64
预测数值 Value	2.226	2.600	2.216
亲水性最强的氨基酸残基 Most hydrophilic amino acid residue	G	T	A
所处位置 Position	494	340	11
预测数值 Value	-1.937	-1.353	-0.789
蛋白总平均亲水性 Grand average of hydropathicity	-0.068	0.424	0.552

为 2.600(表 2); TssC 中位于 11 位的丙氨酸(A), 其亲水性最强, 为 -0.789, 而位于 64 位的异亮氨酸

(I), 其亲水性最弱, 为 2.216(表 2)。

对上述 3 个 Tss 的疏水性、亲水性数值进行统计分析, 结果显示, TssA、TssB、TssC 的疏水性氨基酸残基总和分别为 151.099、233.443、89.995, 而亲水性氨基酸残基数值总和则分别为 -197.140、-68.367、-8.408, 上述结果表明, 仅 TssA 为亲水性蛋白, 其他为疏水性蛋白。

此外, 通过对 Xcr 中的 3 个 Tss 进行理化性质分析, 结果显示, TssA 与 TssC 在理论等电点方面均大于 7, 均属于碱性蛋白, 而 TssB 则属于酸性蛋白; 同时, TssA 与 TssC 在不稳定系数方面均小于 40, 说明上述蛋白是稳定蛋白, 而 TssB 则属于不稳定蛋白(表 3)。

表 3 黄单胞菌 3 个 VI 型分泌蛋白的理化性质

Table 3 The physicochemical property of three type VI secretion proteins in Xcr

名称 Name	相对分子质量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	负电荷氨基酸残基数 Total number of negatively charged residues (Asp + Glu)	正电荷氨基酸残基数 Total number of positively charged residues (Arg + Lys)	分子式 Formula	原子数量 Total number of atoms	半衰期/h Estimated half-life	不稳定性系数 Instability index	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index
TssA	62 963.1	9.27	52	65	C ₂₈₇₀ H ₄₅₃₀ N ₇₄₄ O ₈₀₆ S ₁₉	8 969	30	34.88	97.74
TssB	40 104.7	4.81	25	18	C ₁₇₉₇ H ₂₈₄₆ N ₄₅₆ O ₅₂₅ S ₂₇	5 651	30	41.96	96.79
TssC	13 339.4	7.77	8	9	C ₅₉₃ H ₉₅₆ N ₁₅₈ O ₁₇₆ S ₇	1 890	30	29.16	103.02

2.3 Tss 的转运肽及信号肽情况

结果表明, TssA 以及 TssC 均属于线粒体型(表 4); TssB 没有确定出其定位情况, 有待于今后通

过生物学试验进行研究。尽管 TssA 与 TssC 均定位于分泌途径上, 其预测概率不尽相同, 后者概率较低, 仅为 0.2~0.4, 而前者预测概率则大于 0.8(表 4)。

表 4 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白中转运肽情况

Table 4 The transit peptide of type VI secretion proteins in Xcr

名称 Name	叶绿体型 Chloroplast	线粒体型 Mitochondrial	分泌途径 Secretory pathway	定位情况 Localization	预测概率/% Possibility
TssA	0.014	0.997	0.010	分泌途径 Secretory pathway	>80
TssB	0.090	0.408	0.598	—	<20
TssC	0.146	0.632	0.252	分泌途径 Secretory pathway	20~40

此外, 经信号肽预测, 仅 TssC 含有信号肽序列, 切割位置位于 35~36 之间, 其信号肽序列为 MKLNNQDIANARRTLKTIAYAVASVALFASGAALA; 而 TssA 经 HMM 预测并未发现含有信号肽, NN 预测, 其信号肽的切割位置位于 32~33 之间, 其信号肽序列为 MRSPLFKTGMALCLLALALLTGLYLSSQLTLA; TssB 则未发现明显的信号肽序列。

2.4 Tss 的高级结构

Xcr 中的 Tss 均含有高于 50% 比例的 α 螺旋结构, 3 个 Tss 均含有跨膜螺旋结构(TMhelix)以及

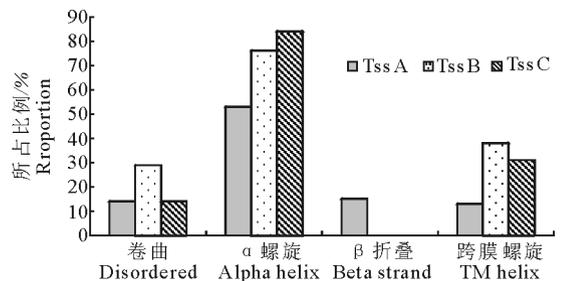


图 3 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白的二级结构分析
Fig.3 The secondary structure character of type VI secretion proteins in Xcr

无规卷曲;而对于 β 转角结构,除 TssA 含有 β 转角外,其他 2 个均不具有该结构(图 3)。同时,对上述 Tss 进行三级结构预测,结果显示,TssA 具有 α 螺旋结构、 β 转角结构以及无规卷曲结构等,而 TssB、TssC 则仅具有 α 螺旋结构以及无规卷曲结构(图 4)。上述 3 个蛋白在模型尺寸上也不尽相同,TssA、TssB、TssC 在 X、Y、Z 3 个坐标轴上的尺寸分别为 85.223、64.676、59.846 Å,57.647、26.857、29.163 Å,33.413、25.068、68.582 Å(图 4)。

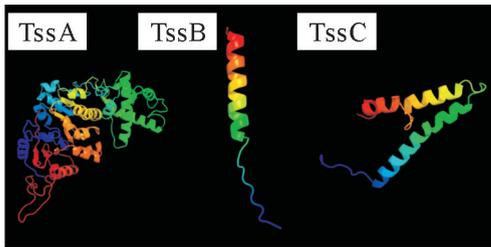


图 4 黄单胞菌 VI 型分泌蛋白的三级结构特征
Fig.4 The tertiary structure character of three type VI secretion proteins in *Xcr*

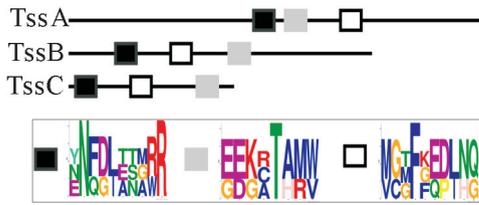


图 5 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白保守 motif 分布情况
Fig.5 The motif of three type VI secretion proteins in *Xcr*

2.5 Tss 的亚细胞定位分析

Xcr 中的 3 个 Tss 均定位于细胞膜上(表 5),上述预测结果与分泌蛋白行使其功能具有一致性。

表 5 黄单胞菌中 VI 型分泌蛋白的亚细胞定位情况

Table 5 The subcellular localization of type VI secretion proteins in *Xcr*

名称 Name	细胞质 Cytoplasmic	细胞膜 Membrane	分泌 Secreted	细胞周质 Periplasmic
TssA	0.00	9.68	0.05	0.28
TssB	0.01	9.99	0.00	0.00
TssC	0.02	9.75	0.22	0.01

2.6 Tss 的保守 motif 找寻

通过利用 MEME 对 *Xcr* 中 3 个 Tss 序列进行 motif 找寻,分别获得 3 个保守的 motif,即 Y(N/E)NF(Q)D(G)L(I)T(E/A)T(S/N)M(G/A)R(W)R,E(G)E(D)K(G)R(C/A)TA(H)M(R)W(V)、M(V)G(C)T(M/G)FK(G/F)E(Q)D(P)L(I)N

(H)Q(G)(图 5)。3 个 Tss 所具有的 3 个 motif 所处的位置不尽相同,而 TssB 与 TssC 中所含的 3 个 motif 排列顺序相对一致(图 5)。

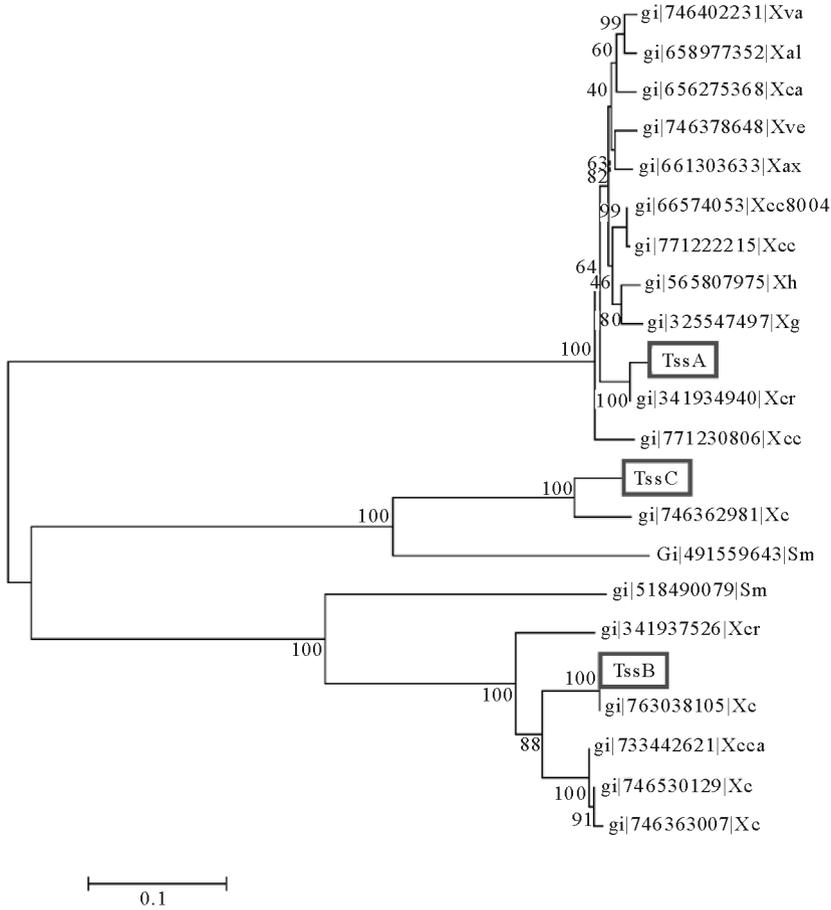
2.7 Tss 的遗传关系分析

通过在 NCBI 中对 *Xcr* 中 3 个 Tss 序列进行 Blastp 搜索,分别获得 TssA、TssB、TssC 的同源序列,对这些序列进行聚类分析。结果显示,就 *Xcr* 中 3 个 Tss 之间的亲缘关系而言,TssA 与 TssC 亲缘关系较近(图 6),这与之前所开展的理化性质分析、转运肽分析结果相吻合;就 *Xcr* 中每个 Tss 与其他物种同源序列之间的亲缘关系而言,TssA 与 *Xcr* 中的 AEL05079.1、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*X. campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)中的 CEM56956.1;TssC 与木薯细菌性叶斑病菌(*X. cassavae*, *Xca*)中的 WP_039407527.1 之间的亲缘关系较近;TssB 与黄单胞菌(*X. campestris*)中的 WP_043922167.1、*Xcr* 中的 AEL07665.1 之间的亲缘关系较近(图 6)。

3 讨论

本研究中 Tss 的获得,是采用对 *Xcr* 已经注释的蛋白数据库进行关键词搜索的方法进行,而未利用模式生物中已知的 Tss 进行 Blastp 比对的方法进行。这是由于,对同属于革兰氏阴性细菌的模式生物——大肠杆菌,全基因组已经释放的 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655、O157 : H7 str. Sakai, IAI39、O83 : H1 str. NRG 857C、O104 : H4 str. 2011C-3493、CFT073 等菌株进行“Type VI secretion protein”关键词搜索,并未发现上述 *E. coli* 含有 Tss 蛋白。同时,以来自于 *Escherichia coli* CAG : 4 的 Tss(蛋白质登录号: WP_001525532.1)序列为源序列,在 NCBI 中进行 Blastp 比对,并未发现与 *X. campestris* 有关的蛋白序列(数据未显示)。

目前,已经有 *X. campestris* 的 5 个菌株(致病变种)完成全基因组测序工作,包括 *Xcr*^[20]、*X. campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913(简称为 ATCC 33913)、B100、str. 8004 以及 *X. campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10(简称为 *Xcv* 85-10)。利用 T346Hunter^[24]对上述菌株(致病变种)进行搜索,除 *Xcv* 含有 T6SS 组分蛋白外,其他则不含有 T6SS 组分蛋白(图 7)。通过对 *Xcv* 85-10 中存在的编码 T6SS 蛋白的基因进行梳理,发现共有 28 个



Xcc8004, Xca, Xc, Xva, Xcc, Xve, Xax, Xh, Xg, Xal, Xcca, Sm 分别为 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str.8004, *Xanthomonas cassavae*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas vasicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas hortorum*, *Xanthomonas gardneri* ATCC 19865, *Xanthomonas alfalfae*, *Xanthomonas campestris* pv. *cannabis*, *Stenotrophomonas maltophilia* 等物种的缩写。Xcc8004, Xca, Xc, Xva, Xcc, Xve, Xax, Xh, Xg, Xal, Xcca, Sm is abbreviations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str.8004; *Xanthomonas cassavae*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas vasicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas hortorum*, *Xanthomonas gardneri* ATCC 19865, *Xanthomonas alfalfae*, *Xanthomonas campestris* pv. *cannabis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, respectively.

图 6 不同黄单胞菌属中 VI 型分泌蛋白彼此之间的遗传关系

Fig.6 The genetic relationships of three type VI secretion proteins in *Xcr* compared with its homologous sequences from other species

基因,分属于 3 个不同的基因簇中(http://bacterial-virulence-factors.cbcp.upm.es/t346Data/public/Xanthomonas_campestris_pv_vesicatoria_str_85_10_chromosome_NC_007508.html#tVIss_ref),其 ID 分别为 XCV2120, XCV2121, XCV2122, XCV2124, XCV2125, XCV2126, XCV2127, XCV2133, XCV2135, XCV2136, XCV2137, XCV2138, XCV2139, XCV2143, XCV2147, XCV4208, XCV4209, XCV4210, XCV4211, XCV4214, XCV4217, XCV4236, XCV4237, XCV4238, XCV4239, XCV4241, XCV4242, XCV4243。

利用上述 T6SS 蛋白序列,在 NCBI 中对 *Xcr* 进行 Blastp 同源序列比对分析,发现 AEL05260.1, AEL05790.1, AEL05876.1, AEL06072.1, AEL06242.1, AEL07918.1, AEL08315.1, AEL08548.1, AEL08591.1, AEL07592.1, AEL08270.1, AEL07131.1 等 12 个蛋白与 *Xcv* 85-10 中的 XCV2147, XCV2137 以及 XCV2127, XCV4236 具有较高的同源性,然而,蛋白注释名称却不是 VI 型分泌系统或 VI 型分泌蛋白。因此, *Xcr* 中 Tss 数量是否仅有 3 个,有待于利用其他方法进一步进行明确。上述研究工作为进一步开展同属于黄

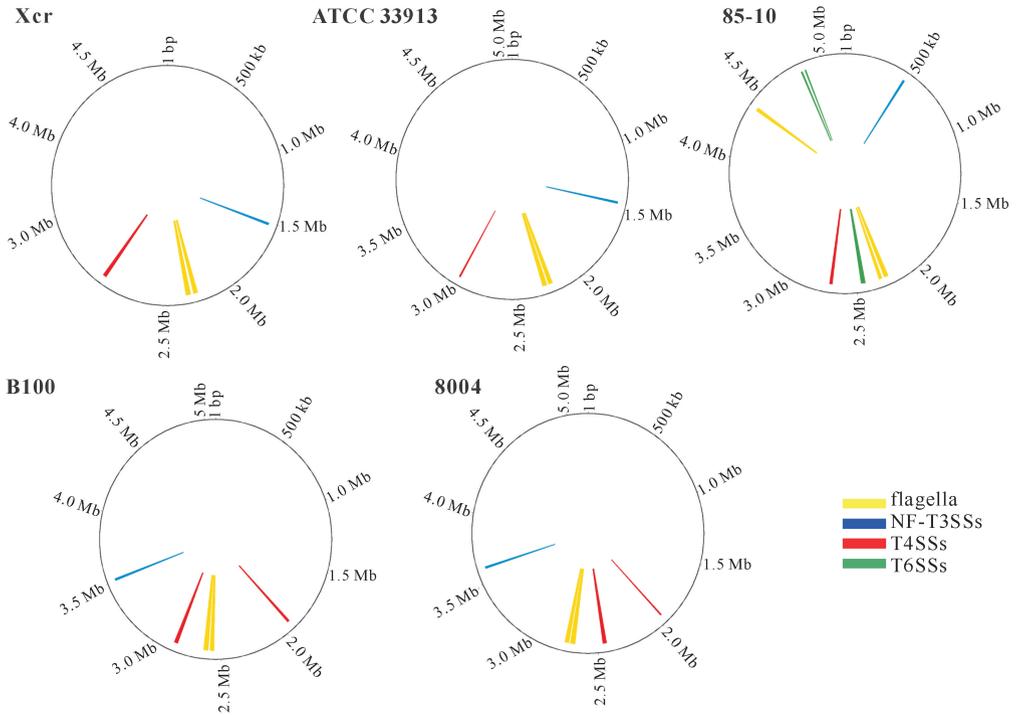


图 7 黄单胞菌的 5 个菌株(致病变种)中所含 T3SS、T4SS 和 T6SS 情况

Fig.7 The distribution of T3SS, T4SS and T6SS in five isolates belonged to *X. campestris*

单胞菌属的核桃细菌性黑斑病菌(*X. campestris* pv. *juglandis*)的研究提供了诸多数据支持,同时,也为利用比较基因组学深入解析上述病菌的 Tss 功能研究提供重要的理论依据。

Xcr 可以侵染茄科、十字花科等诸多蔬菜,引起植物叶斑病。本研究通过对 *Xcr* 全蛋白序列进行关键词搜索,获得了 3 个 Tss 蛋白序列,并利用一系列生物信息学分析工具,发现 3 个 Tss 均具有跨膜结构域,根据氨基酸大小,分别命名为 TssA、TssB、TssC;仅 TssC 具有典型的信号肽序列;同时,明确 Tss 均含有较高比例的 α 螺旋结构;3 个 Tss 均定位在细胞膜上以及具有 3 个保守的 motif。此外,通过对 *Xcr* 与其他植物病原菌中 Tss 的遗传关系分析,明确其与 *Xcc*、*Xca* 等黄单胞菌属中的病菌具有较高的同源序列,具有较近的亲缘关系。

参 考 文 献

[1] 韩长志.植物与病原菌互作理论研究进展[J].河南农业科学, 2012,41(11):5-8.
 [2] 饶贤才,胡福泉.分子微生物学前沿[M].北京:科学出版社, 2013.
 [3] DELEPELAIRE P.Type I secretion in gram-negative bacteria [J].Biochimica et Biophysica Acta,2004,1694(1):149-161.

[4] 邱慧.水稻细菌性褐条病菌 *ClpB* 和 *ImpM* 基因的致病性及胁迫条件下全蛋白的表达分析研究[D].杭州:浙江大学,2014.
 [5] 周奕景.水稻细菌性条斑病菌中受 DSF 群体感应系统调控的外泌蛋白的功能研究[D].南京:南京农业大学,2013.
 [6] 阳芬,杨秋林,杜宗敏.耶尔森菌 III 型分泌系统研究进展[J].生物技术通讯,2013(3):418-422.
 [7] 吴胜勇,何虹,宋元林.绿脓杆菌 III 型分泌系统[J].现代预防医学,2008(23):4761-4763.
 [8] 王芳,袁静,何湘,等.志贺菌 III 型分泌系统研究进展[J].中国病原生物学杂志,2009(3):215-218,231.
 [9] 杨莉,张力群,贺伟,等.III 型分泌系统是欧美杨溃疡病菌 *Lonsdalea quercina* 重要的致病因子[J].植物病理学报,2014(5):512-520.
 [10] 严婉荣.瓜类细菌性果斑病菌 *hrcN* 基因的克隆及功能分析[D].长沙:湖南农业大学,2012.
 [11] 张晓平.白叶枯病菌的致病性及其无毒因子与水稻抗病基因的分子互作研究[D].北京:中国农业科学院,2013.
 [12] 原志伟,蒋颖,王建业,等.V 型分泌系统菌体表面展示 F18 大肠杆菌黏附素及其受体结合位点的确定[J].微生物学报,2007,47(2):319-323.
 [13] CIANFANELLI F R, MONLEZUN L, COULTHURST S J. Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon[J].Trends in microbiology,2016,24(1):51-62.
 [14] ROGERS A, TOWNSLEY L, GALLEGU-HERNANDEZ A L, et al.The LonA protease regulates biofilm formation, motility, virulence, and the type VI secretion system in *Vibrio chol-*

- erae* [J]. Journal of bacteriology, 2016, 198(6): 973-985.
- [15] 姚丰华, 张钰, 朱国强. 细菌 VI 型分泌系统结构与调控的研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(6): 80-86.
- [16] 李俊. 副溶血弧菌丝氨酸/苏氨酸蛋白酶对 VI 型分泌系统的调控作用研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [17] 张利娟, 叶仕根, 杨晓宇, 等. 革兰氏阴性细菌 VI 型分泌系统的研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(6): 692-698.
- [18] 张丽勃. 植物青枯菌 GMI1000 菌株 VI 型分泌系统基因功能的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [19] 王敏. 伤寒沙门菌 VI 型分泌系统的鉴定及其功能的初步研究 [D]. 徐州: 江苏大学, 2011.
- [20] ROUX B, BOLOT S, GUY E, et al. Genomics and transcriptomics of *Xanthomonas campestris* species challenge the concept of core type III effectome [J]. BMC genomics, 2015, 16(1): 975-993.
- [21] 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.
- [22] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic acids research, 2009, 37: 202-208.
- [23] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular biology and evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [24] MARTÍNEZ-GARCÍA P, RAMOS C, RODRÍGUEZ-PALENZUELA P. T346Hunter: a novel web-based tool for the prediction of type III, type IV and type VI secretion systems in bacterial genomes [J]. PLoS One, 2014, 10(4): e0119317-e0119317.

Bioinformatics analysis of type VI secretion proteins in *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C

HAN Changzhi¹ WANG Juan²

1. The Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province / College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. Key Laboratory for Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, State Forestry Administration / Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants / Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650201, China

Abstract To determine the types, signal peptide, and conserved motif of the type VI secretion proteins (Tss) in *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C (*Xcr*), and to provide an important theoretical guidance for clarifying the Tss of the other *Xanthomonas* pathogen, Tss sequence of *Xcr* from the protein databases was searched using keywords, and the conserved domain was searched using SMART online. The signal peptide, transmembrane domain structure, the tertiary structure and conserved motif were analyzed. Meanwhile, the genetic relationships was analyzed using comparative Tss in *Xcr* and homologous sequences of other species. There are three Tss in *Xcr*, namely TssA, TssB, TssC, which have more than 50% helical secondary structure and only TssC contains the typical signal peptide sequence. All the 3 Tss positioned in the plasma membrane, and each has 3 conserved motifs. Based on the genetic analysis of Tss, it is suggested that *Xcc* and *Xca* are closely related to *Xcr*.

Keywords *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* 756C; type VI secretion; type six secretion protein; *Xanthomonas*

(责任编辑: 边书京)