



西瓜食酸菌抗铜基因 *cueR* 的生物信息学分析及功能验证

颀兵兵¹ 刘君^{*2} 优丽图孜·乃比¹ 张春博²

1 新疆农业大学农学院 新疆 乌鲁木齐 830052

2 新疆农业大学林学与园艺学院 新疆 乌鲁木齐 830052

摘要:【背景】CueR 被证实在模式细菌大肠杆菌的 Cue 抗铜系统中参与转录调控, 西瓜食酸菌 (*Acidovorax citrulli*) 中是否有类似的机制尚不清楚。【目的】鉴定西瓜食酸菌中的 *cueR* 基因、分析其编码蛋白的特点与功能, 可以为进一步探究类 Cue 系统在西瓜食酸菌铜稳态中的作用机制奠定基础。【方法】以大肠杆菌等 4 个模式细菌中已经鉴定的 CueR 为参照, 运用生物信息学手段对西瓜食酸菌的 CueR (AcCueR) 与大肠杆菌的 EcCueR、铜绿假单胞菌的 PaCueR、沙门氏菌的 SeCueR、霍乱弧菌的 VcCueR 蛋白进行结构、性质、亚细胞定位、互作因子等特征分析; 利用同源重组插入突变技术构建西瓜食酸菌 FC440 菌株 *cueR* 基因的突变体, 并制备突变体基因功能互补菌株, 比较分析各菌株抗铜性表型。【结果】西瓜食酸菌和铜绿假单胞菌的 CueR 序列相似性最高; 5 个细菌的 CueR 蛋白均属于 HTH-MerR-SF 超家族, 三级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成; 5 种蛋白结构相似; AcCueR 可以与西瓜食酸菌中 P 型 ATP 酶(即 CopA)、多铜氧化酶 CueO 产生互作, 且 *copA* 启动子中存在一个与 CueR 结合的回文结构。在含 Cu^{2+} 培养基上, 突变菌株 FC440($\Delta cueR$) 生长能力明显减弱, 基因功能互补菌株 FC440($\Delta cueR$ -*cueR*) 的生长能力则完全恢复。【结论】西瓜食酸菌中的 *cueR* 基因与菌的抗铜性相关, 其 AcCueR 蛋白与大肠杆菌等菌中的 CueR 具有相似的结构与功能, 在西瓜食酸菌中可能存在类似于大肠杆菌的 Cue 抗铜系统。

关键词: 西瓜食酸菌, *cueR* 基因, 抗铜性, 突变体, 生物信息学

Bioinformatics analysis and functional verification of copper resistance gene *cueR* in *Acidovorax citrulli*

XIE Bing-Bing¹ LIU Jun^{*2} Youlituzi Naibi¹ ZHANG Chun-Bo²

1 College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

2 College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

Abstract: [Background] CueR is involved in transcriptional regulation of Cue copper-resistant system in model bacteria *Escherichia coli*. However, if a similar system is present in *Acidovorax citrulli*, a bacterial plant pathogen, remains unclear. [Objective] Analyzing the *cueR* gene and its protein in *Acidovorax citrulli* can facilitate the mechanism study of copper resistance for this destructive phytopathogen. [Methods] AcCueR of *Acidovorax citrulli* was identified and compared with CueRs from four representative bacteria,

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31560498)

***Corresponding author:** E-mail: liujem@126.com

Received: 18-08-2019; **Accepted:** 11-11-2019; **Published online:** 29-11-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31560498)

***通信作者:** E-mail: liujem@126.com

收稿日期: 2019-08-18; **接受日期:** 2019-11-11; **网络首发日期:** 2019-11-29

i.e. EcCueR of *E. coli*, PaCueR of *Pseudomonas aeruginosa*, SeCueR of *Salmonella* and VcCueR of *Vibrio cholerae*. The characteristics of the structure, physicochemical properties, subcellular localization, and interaction proteins of these CueRs were analyzed by bioinformatics methods. The *cueR* gene mutant was prepared through homologous recombination with *Acidovorax citrulli* strain FC440. The phenotypes of copper resistance of wild type strain, *cueR* gene mutant, and gene functional complementary strain were also assayed. **[Results]** Comparative sequence analysis of CueR proteins revealed that AcCueR and PaCueR have the highest sequence similarity. All these five CueR proteins belong to HTH-MerR-SF super family. The tertiary structure is mainly composed of alpha-helix and coiled-coil. The CueR proteins of different bacteria are similar. AcCueR can interact with P-type ATPase (CopA) and multi-copper-oxidase (CueO) in *Acidovorax citrulli*. In the promoter of *copA*, there is a typical palindrome motif that binds to CueR. When challenged with Cu^{2+} , the *cueR* mutated strain FC440(Δ *cueR*) exhibited a significantly reduced in growth. Consistently, the growth capacity of the complementary strains completely recovered. **[Conclusion]** The *cueR* gene contributes to its copper resistance in *Acidovorax citrulli*. The AcCueR protein has a similar structure and function compared with CueR in *E. coli* and other bacteria. These results indicate that the Cue copper-resistance system works in *Acidovorax citrulli*.

Keywords: *Acidovorax citrulli*, *cueR* gene, Copper resistance, Mutant, Bioinformatics

革兰氏阴性细菌——西瓜食酸菌(*Acidovorax citrulli*)^[1]可以导致葫芦科植物产生细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)。该病害在高温高湿环境下可以使西瓜、甜瓜以及黄瓜等葫芦科植物发生病斑、萎蔫或果实腐烂^[2],是一种可通过种子传播的毁灭性病害。在世界经济一体化的大背景下,该病害已通过全球贸易活动在很多个国家传播开来。在一些商品西瓜地,由 BFB 导致的经济损失在 50%甚至 90%以上^[3-5]。有研究证实^[6-8],BFB 的病菌群体中至少存在两个在遗传和生化上有差异的亚群——亚群 I 和亚群 II。亚群 I 菌株多数对铜不敏感,这表明目前以含铜制剂为主要杀菌剂的防控措施对 BFB 基本无效。至今为止,尚没有发现抗 BFB 的种质资源。因此,研究该细菌的抗铜机制,可以为开发有效防控 BFB 的新方法、新途径提供理论依据。

西瓜食酸菌与大肠杆菌等大多数微生物一样,其代谢过程和呼吸酶需要极少量的铜^[9];与此同时,这些生物必须将细胞内的铜含量维持在有毒阈值以下^[9]。因此,微生物细胞需要一系列的铜稳态机制来控制铜离子的吸收与外排^[9]。Cue 系统是大肠杆菌重要的铜离子外排泵之一,在细菌铜稳态中起重要作用。该系统中的转录调控因子 CueR 与 P

型 ATP 酶(CopA)和多铜氧化酶(CueO)共同参与铜离子的调控与转运^[10]。2013 年赵文龙的研究证实,西瓜食酸菌中的类 P 型 ATP 酶(Aave-0034)与该菌的抗铜性相关^[11];2014 年李强的实验确认注释为多铜氧化酶的基因 *cueO* (Aave-1810)是该菌的抗铜性相关基因^[12]。基于以上研究发现可以推测,在西瓜食酸菌中可能存在类似 Cue 的抗铜系统。本研究以已经鉴定的大肠杆菌等细菌的 CueR 为参照,利用生物信息学手段分析西瓜食酸菌中调控 *copA* 和 *cueO* 基因表达的因子 CueR,并对该基因进行功能验证,旨在为进一步研究西瓜食酸菌的类 Cue 系统的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中的 CueR 蛋白分别来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)及西瓜食酸菌 FC440 (*Acidovorax citrulli* FC440),其中各参考菌的氨基酸序列来自于 NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (表 1),西瓜食酸菌 FC440 由南京农业大学胡白石教授惠赠。

1.2 菌株、质粒及引物

本研究中所用的菌株、质粒见表 2, 引物见表 3。

1.3 主要试剂和仪器

Taq 酶、*EcoR* I、*Hind* III, 宝生物工程(大连)有限公司; T4 DNA ligase, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、DNA 质粒提取试剂盒及 DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司; 抗生素, Sigma 公司; 其余化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

Eppendorf 台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; PCR 仪, 宝生物工程(大连)有限公司; 电泳仪, 北京市六一生物技术有限公司; 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; 紫外分光光度计, 济南赛富生物科技有限公司; 凝胶成像分析系统, 上海伯建生物科技有限公司。

1.4 培养基及培养条件

KMB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 磷酸氢二钾 1.5, 硫酸镁 1.5, 琼脂 15.0, 调 pH 至 7.0。

表 1 细菌中 CueR 蛋白的基本信息

Table 1 Basic information of CueR protein in bacteria

蛋白*	类型	物种名称	残基数	蛋白 ID	来源
Protein	Description	Species	Numbers of residue	Protein ID	Sources
AcCueR	MerR family transcriptional regulator	<i>Acidovorax citrulli</i> FC440	143	QDD67396	This study
EcCueR	DNA-binding transcriptional regulator CueR	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 ^T	135	NP-415020.1	[13]
PaCueR	protein CueR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 ^T	132	NP-253466.1	[14]
SeCueR	Cu(I)-responsive transcriptional regulator	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2 ^T	138	NP-459494.1	[15]
VcCueR	MerR family transcriptional regulator	<i>Vibrio cholera</i> O1 biovar E1 Tor str. N16961 ^T	139	NP-230621.1	[16]

注: *: 命名规则为属名与种名的首字母加 CueR 蛋白。

Note: *: Proteins are named by initials of genus name and species name plus CueR protein.

表 2 供试菌株、质粒

Table 2 Bacterial strains, plasmid used in this study

菌株、质粒 Strains, plasmids	特性 Characteristics	来源 Sources
Strains		
<i>Acidovorax citrulli</i> strains		
FC440	Amp ^R ; Wild type	Our lab
FC440(Δ <i>cueR</i>)	Amp ^R ; Kan ^R ; FC440 mutant defective in <i>cueR</i>	This study
FC440(Δ <i>cueR</i> - <i>cueR</i>)	Amp ^R ; Kan ^R ; Gm ^R ; FC440(Δ <i>cueR</i>) complemented with <i>cueR</i> gene expressed by vector pBBR1MCS-5	This study
<i>E. coli</i> strains		
Trans110	RpsL(Str ^R) thr leu thi-1 lacY galK galT are tonA tsx dan dcm supE44(Δ (lac-proAB)	TIANGEN
Trans110(pBBR1MCS-5- <i>cueR</i>)	Gm ^R ; <i>E. coli</i> Trans110 strain containing vector pBBR1MCS-5- <i>cueR</i>	This study
S17-1	<i>E. coli</i> 294, thi RP4-2-Tc::Mu-Kan::Tn7 chromosomally integrated	Our lab
S17-1(pK19mob2 Ω HMB-TY)	Kan ^R ; <i>E. coli</i> S17-1 strain containing vector pK19mob2 Ω HMB-TY	This study
Plasmids		
pMD19-T	Amp ^R ; Cloning vector	TaKaRa
pMD19-T-TY	Amp ^R ; pMD19-T vector containing a 286-bp fragment with the <i>cueR</i> gene	This study
pK19mob2 Ω HMB	Kan ^R ; Suicide vector	Our lab
pK19mob2 Ω HMB-TY	Kan ^R ; pK19mob2 Ω HMB vector containing a 286-bp fragment with the <i>cueR</i> gene	This study
pBBR1MCS-5	Gm ^R ; Expression vector	Our lab
pBBR1MCS-5- <i>cueR</i>	Gm ^R ; pBBR1MCS-5 vector containing <i>cueR</i> gene; Used to complement FC440(Δ <i>cueR</i>)	This study

注: Amp^R、Kan^R、Gm^R 分别代表氨苄青霉素抗性、卡那霉素抗性和庆大霉素抗性。

Note: Amp^R, Kan^R and Gm^R represent resistant to ampicillin, kanamycin, and tetracycline, respectively.

表 3 供试引物

Table 3 Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')	来源 Sources
<i>cueR</i> -F	<u>AACTGCAGT</u> CGATCCCGTGCCCATC (<i>Pst</i> I)	This study
<i>cueR</i> -R	CGGAATTC <u>CGCCAGG</u> TCGTTCGATG (<i>EcoR</i> II)	This study
<i>cueR</i> -QF	CCAAGCTT <u>TCCGGCATGG</u> CACAGGC (<i>Hind</i> III)	This study
<i>cueR</i> -QR	CGGAATTC <u>CGCACGGCGT</u> TCAGTTCAC (<i>EcoR</i> I)	This study
AAC-1	GACCAGCCCAACTGGGAC	[17]
AAC-2	CTGCCGCACTCCAGCGA	[17]

注: 下划线表示酶切位点.

Note: The restriction enzyme cutting sites were underlined.

NB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 牛肉膏 3.0, 调 pH 至 7.0。

LB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 16.0, 调 pH 至 7.0。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 调 pH 至 7.0。

SOB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 氯化钾 3.2, 调 pH 至 7.0。

西瓜食酸菌在 KMB 固体培养基或 NB 液体培养基中于 28 °C、220 r/min 下培养; 大肠杆菌在 LB 液体、固体或 SOB 培养基中于 37 °C、220 r/min 下培养。本研究中西瓜食酸菌野生型或其衍生菌使用的抗生素浓度为 Amp 30 µg/mL, Kan 50 µg/mL, Gm 50 µg/mL。大肠杆菌的培养中使用的抗生素浓度为 Gm 20 µg/mL, Amp 100 µg/mL, Kan 50 µg/mL。

1.5 生物信息学分析

采用 MEGA 7.0 构建进化树^[18], 以邻近法 (neighbor-joining) 自举(bootstrap) 1 000 次以评估其可靠性。应用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1) 工具进行保守结构域预测及分析; 利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 工具分析蛋白的理化特性以及亲疏水性; 利用 PSORT (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) 预测蛋白质可能亚细胞定位; 利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对 5 种 CueR 蛋白进行 3D 同源建模; 应用 String (<https://string-db.org/>)

数据库预测西瓜食酸菌中 AcCueR 蛋白与其他蛋白质相互作用关系。利用在线软件 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/>) 预测细菌 CopA 的基因转录启动子序列。

1.6 突变体和基因功能互补菌株的制备

以野生型全基因组 DNA 为模板, 使用引物 *cueR*-F/*cueR*-R (表 3) 扩增得到 *cueR* 基因约 300 bp 的同源片段。PCR 反应体系: 2×Primer STAR GC Buffer (Mg²⁺) 10 µL, dNTPs (10 mmol/L) 1.6 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 1 µL, 模板 DNA (0.03 mg/L) 1 µL, Primer STARTM HS DNA Polymerase (2.5 U/L) 0.2 µL, ddH₂O 补至 20 µL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。通过回收、连接转化技术得到自杀质粒 pK19mob2ΩHMB-TY。采用双亲杂交法获得基因突变菌株 FC440(Δ*cueR*)。使用引物 *cueR*-QF/*cueR*-QR (表 3) 验证目的基因是否被插入突变, 即以全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 10×*rTaq* DNA Buffer 2 µL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 µL, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 µL, *cueR*-QF 和 *cueR*-QR (10 µmol/L) 各 1 µL, 模板 DNA (0.03 mg/L) 1 µL, Primer STARTM HS DNA Polymerase (2.5 U/L) 0.2 µL, ddH₂O 补至 20 µL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。目的基因被插入突变时, 无预期大小片段产生, 野生型则有。基因功能互补菌株以野生型基因组 DNA 为模板, 使用引物 *cueR*-QF/*cueR*-QR 扩增 *cueR* 基因全长。PCR 反应

体系: 2×Primer STAR GC Buffer (Mg^{2+}) 10 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.6 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA (0.03 mg/L) 1 μ L, Primer STARTMHS DNA Polymerase (2.5 U/L) 0.2 μ L, ddH₂O 补至 20 μ L. PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。通过回收、连接转化等步骤得到载体命名为 pBBR1MCS-5-*cueR*; 通过双亲杂交法将该载体转入突变菌株 FC440(Δ *cueR*)而得到互补菌株 FC440(Δ *cueR-cueR*)。

1.7 抗铜性检测

用 NB 培养基将野生型 FC440、突变菌株 FC440(Δ *cueR*)、互补菌株 FC440(Δ *cueR-cueR*) 28 °C、220 r/min 培养 12 h, 取菌液 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加 ddH₂O 重悬菌体调 OD_{600} 至 0.5, 取菌悬液 0.2 μ L 转接至含 1.75、2.25、2.75、3.00、3.15、3.30 mmol/L CuSO₄ 的 KMB 平板上, 于 28 °C 培养 48 h, 每隔 12 h 采集图片。每个浓度至少重复 3 次。该指标进行了 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 多序列比对及聚类分析

从细菌 CueR 蛋白质序列比对的结果(图 1)可以看出: 5 种蛋白氨基酸序列具有较高的相似性, 均含有保守的 Helix-turn-helix (H-T-H) DNA 结合基序。细菌 CueR 蛋白的聚类分析表明: 西瓜食酸菌和铜绿假单胞菌的 CueR 蛋白质序列相似性最高; 结构域分析显示出 5 种蛋白均具有保守的 HTH-MerR 结构域(图 2)。

2.2 AcCueR 蛋白的特性分析

蛋白特性分析结果显示(表 4): 5 种蛋白质均为不稳定性蛋白质(<40 稳定; >40 不稳定); 由于亲水性平均系数均为负数(<0 亲水; >0 疏水), 因此 5 种 CueR 蛋白均为亲水性蛋白, 且 N 端均为 Met, Met 被视为与金属离子结合的氨基酸; 除 EcCueR 为酸性蛋白外, 包括 AcCueR 在内的其他蛋白均为碱性蛋白; 从分子量上可以看出, AcCueR 蛋白分子量比其他菌的 CueR 大, 其他几个 CueR 蛋白的分子量相近。蛋白质可能分布的亚细胞位点结果显示, 5 种 CueR 蛋白的亚细胞位点均为任何位置。

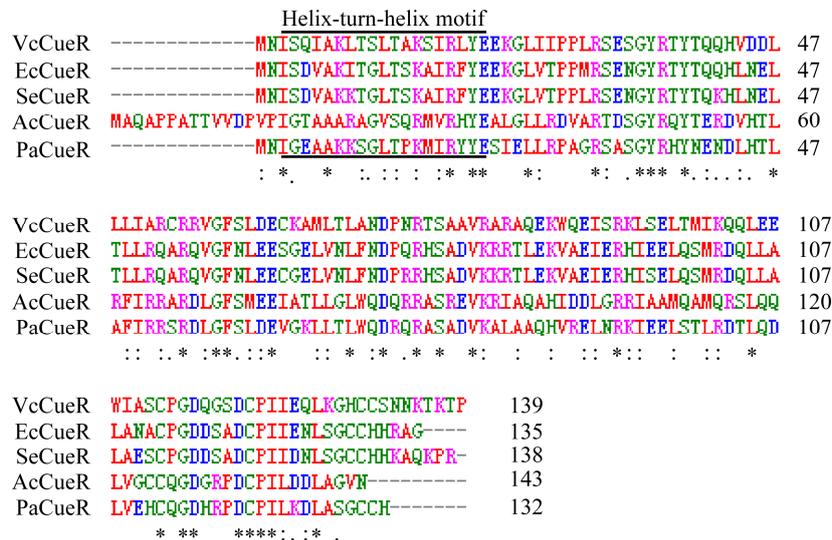


图 1 不同细菌的 CueR 蛋白多序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of CueR proteins

注: *表示该列氨基酸完全一致; :表示该列不完全一致, 但有高度保守的氨基酸; .表示该列不完全一致, 但有一般保守的氨基酸; 空白表示该列氨基酸序列差异较大; -表示非同源区域。

Note: *: The identical residues; :: The highly conserved residues; .: The conserved residues, while diverse residues are left blank. -: The the non-homologous region.

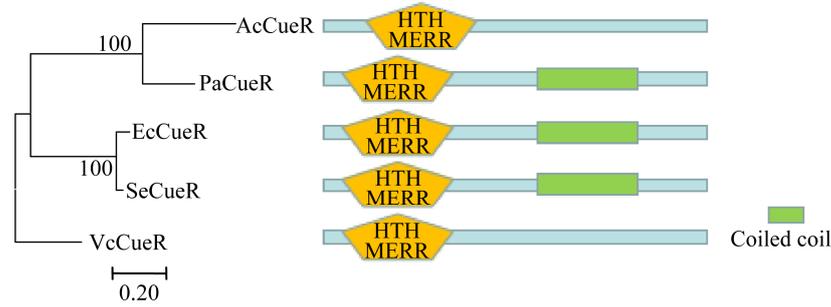


图 2 细菌 CueR 蛋白系统进化树及保守结构域

Figure 2 Phylogenetic analysis and domain architecture of CueR protein in bacteria

注: 标尺表示遗传距离, 0.20 表示每 100 个核苷酸/氨基酸中有 20 个不同。

Note: The scale bar indicates genetic distance, 0.20 indicates 20 differences per 100 nucleotides/amino acids.

表 4 不同细菌 CueR 蛋白理化性质、亚细胞位点及亲疏水性分析

Table 4 Physicochemical properties, subcellular location and hydrophobicity analysis of CueR proteins

蛋白名称 Proteins name	分子量 Molecular weight (Da)	理论等电点 Theoretical pI	蛋白不稳定指数 Protein instability index (U)	亲水性平均系数 Average coefficient of hydrophilicity	N 端氨基酸 Amino acids of the N-terminal	亚细胞位点 Subcellular location
AcCueR	15 898.16	9.05	57.02	-0.352	Met	-
EcCueR	15 235.16	5.72	64.31	-0.579	Met	-
PaCueR	15 015.06	7.73	54.10	-0.591	Met	-
SeCueR	15 647.78	7.67	58.54	-0.685	Met	-
VcCueR	15 693.06	8.78	47.75	-0.492	Met	-

注: -: 任何位置。

Note: -: Any other location.

2.3 CueR 蛋白 3D 同源建模分析

为了直观地了解 CueR 蛋白的结构, 通过在线软件 SWISS-MODEL 对 5 种 CueR 蛋白进行 3D 同源建模(图 3)。预测结果显示: 5 种 CueR 蛋白序列与模板的一致性均>30%, 且 5 种 CueR 蛋白氨基酸覆盖率均≥90%, 同源建模可信度为 100% (表 5)。分析蛋白质构象可知: 5 种 CueR 蛋白的主要结构

均由 α 螺旋和无规则卷曲构成, 且均含有螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)区域。

2.4 CueR 互作蛋白分析

对西瓜食酸菌 FC440 基因组数据分析显示: AcCueR 与 CopA (P 型 ATP 酶)和多铜氧化酶 CueO 之间均具有互作关系, 这一结果与大肠杆菌 EcCueR 蛋白的互作关系结果表现一致(图 4)。

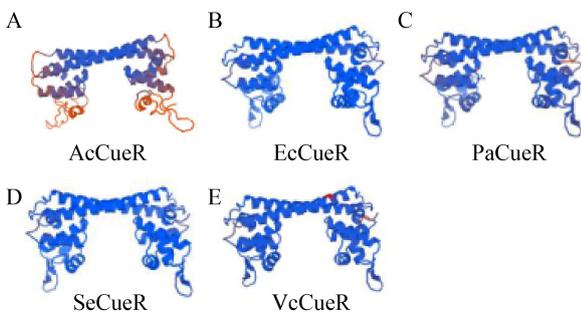


图 3 不同细菌 CueR 蛋白的 3D 结构图

Figure 3 3D structure map of different CueR proteins

表 5 不同细菌 CueR 蛋白三级结构比较分析与质量评价
Table 5 Comparative analysis and quality evaluation of tertiary structure of different CueR proteins

蛋白简称 Proteins name	一致性 Identity (%)	覆盖率 Coverage (%)	模板 Template	建模质量 评价 GMQE
AcCueR	33.59	90	4ua1.1.B	0.63
EcCueR	100.00	100	4w1w.2.B	0.98
PaCueR	48.85	99	4w1w.2.B	0.81
SeCueR	91.79	97	4w1w.2.B	0.94
VcCueR	54.55	95	4w1w.2.B	0.81

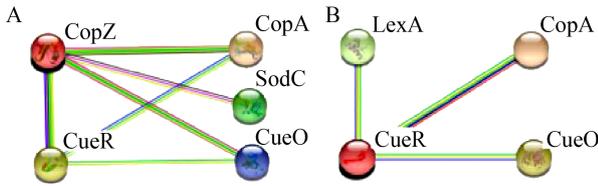


图4 CueR的互作蛋白预测

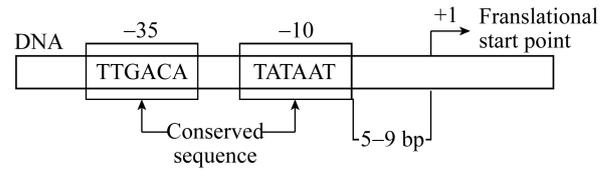
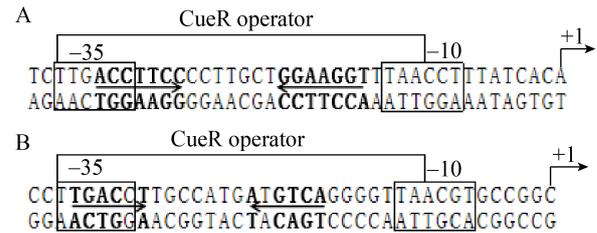
Figure 4 Prediction of CueR interacting proteins

注: A: AcCueR 互作蛋白; B: EcCueR 互作蛋白。

Note: A: AcCueR interacting proteins; B: EcCueR interacting proteins.

2.5 *copA* 基因启动子分析

启动子是通过与 RNA 聚合酶相互作用, 从而影响转录起始频率和位置的 DNA 序列^[19]。细菌启动子具有普遍的一些特征, 包括转录起始点、-10 区、-35 区以及-10 和-35 区之间较为严格的间隔序列(图 5)^[20]和回文基序(palindrome motif)等, RNA 聚合酶可以与-10 区和-35 区结合从而起始转录^[19,21]。在大肠杆菌基因启动子中, -35 区(TTGACA)和-10 区(TATAAT)的碱基高度保守^[19]。对大肠杆菌 K-12 的 *copA* 启动子研究发现(图 6A)^[9,13], 其基因上游-10 区和-35 区之间含 19 bp 的间隔序列, -35 区有 5/6 的序列与大肠杆菌启动子-35 区序列一致(TTGACC 和 TTGACA 比较), -10 区的 1/2 序列与大肠杆菌的-10 区序列一致(TAACCT 和 TATAAT 比较); 且体外实验证实 CueR 蛋白可以与该段 21 bp 的回文结构(两个箭头间包含的区域: 5'-ACCTTCN₇GGAAGGT-3', 箭头所示部分为 7 bp 的二元对称序列(the dyad symmetrical sequence), N₇ 示二元对称序列间的碱基数, 下同)结合, 从而调控 *copA* 基因的转录表达。本研究分析了西瓜食酸菌中 *copA* 基因上游序列(图 6B), 通过预测发现-10 区和-35 区之间存在 19 bp 的间隔序列, 且具有长度为 19 bp 的回文结构(两个箭头包含的区域: 5'-TGACCTN₇ATGTCA-3', 灰色部分示非对称碱基); 与大肠杆菌 K12 的 *copA* 启动子序列相比, 其-35 区序列完全相同, -10 区序列仅存在一个碱基不同, 回文结构中的二元对称序列由非连续性的 6 bp 碱基组成。综合分析表明,

图5 细菌启动子模型^[20]Figure 5 The model illustrating the elements of the promoter of the bacterial gene^[20]图6 西瓜食酸菌和大肠杆菌 *copA* 基因上游序列特点Figure 6 Upstream sequences of *copA* gene in *A. citrulli* and *E. coli*

注: A: 大肠杆菌 *copA* 启动子核心元件^[9]; B: 西瓜食酸菌 *copA* 启动子核心元件。-10 和-35 区序列用方框标出, 回文序列用箭头和粗体标记, 转录起始位点用弯曲的箭头表示。

Note: A: Core elements of the promoter of *copA* in *E. coli*^[9]; B: Core elements of the promoter of *copA* in *Acidovorax citrulli*. The -10 and -35 sequences are in boxes, and the palindromic sequence is marked with arrows and bold text, the transcriptional start site is indicated by a bent arrow.

西瓜食酸菌 *copA* 基因上游存在启动子序列, 其特征与大肠杆菌 K12 的 *copA* 启动子高度相似, 推测为西瓜食酸菌 CueR 的结合位点。

2.6 *cueR* 基因突变菌株及互补菌株的获得

将 *cueR* 基因内部 296 bp 的片段连接到自杀载体 pK19mob2ΩHMB 上, 获得重组载体 pK19mob2ΩHMB-TY; 采用双亲杂交法获得基因突变的菌株 FC440($\Delta cueR$), 经引物 *cueR*-QF/*cueR*-QR 扩增检测无法得到 458 bp 左右的条带, 而野生型基因组 DNA 则可以扩增获得, 证明目的基因已经被插入突变。*cueR* 基因(GenBank 登录号 MK726380)全长连接到载体 pBBR1MCS-5, 获得重组载体 pBBR1MCS-5-*cueR*。采用双亲杂交法将互补载体 pBBR1MCS-5-*cueR* 转入 FC440($\Delta cueR$) 中, 获得基因互补菌株 FC440($\Delta cueR$ -*cueR*)。获得的基因突变体及互补菌

株经用西瓜食酸菌特异性引物 AAC-1/AAC-2 检测均获得 246 bp 的特异性片段, 证明为西瓜食酸菌。

2.7 *cueR* 基因突变体及其互补菌株的抗铜性表型

由含铜培养基上的生长情况可以看出(图 7), 突变菌株 FC440($\Delta cueR$)对铜胁迫有显著的敏感性, 随着铜浓度增加生长能力明显减弱, 而基因互补菌株 FC440($\Delta cueR$ -*cueR*)表现与野生型相似, 即对铜的耐受性恢复。研究证实 *cueR* 基因与西瓜食酸菌的抗铜性有关。

3 讨论与结论

研究表明, 生活在较高金属浓度环境中的细菌, 其胞内金属稳态的维持对于细菌生长至关重要, 因此, 细胞已经发展出多种调节细胞内金属浓度的方法^[10]。大肠杆菌中由转录调控因子 CueR、P 型 ATP 酶(CopA)和多铜氧化酶 CueO^[22]组成的 Cue 系统对铜离子的调节就是其中之一, 其中 CueR 对细胞内金属离子作出反应, 随着胞内铜离子水平的升高, CueR 促进 *copA* 和 *cueO* 的转录表达从而将 Cu^+ 转运至周质空间并氧化为 Cu^{2+} 。研究发现铜离子刺激下 Cue 系统的转录水平最高可达 12 倍^[13]。在西瓜食酸菌中, 类 P 型 ATP 酶^[11]和多铜氧化酶 CueO^[12]已经被发现, 但这两个基因的转录调控因子尚未被鉴定识别。

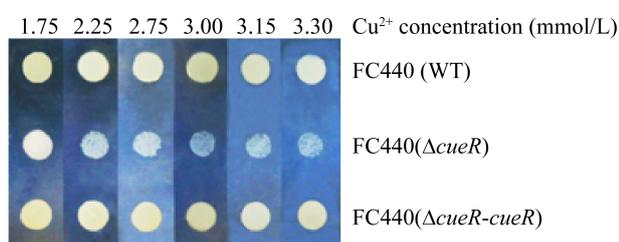


图 7 西瓜食酸菌 *cueR* 基因突变体及其互补菌株在含铜培养基上的生长表型

Figure 7 The growth phenotype of *Acidovorax citrulli cueR* gene mutants and complementary strains on copper-containing media

注: 图片采集于接菌 48 h 后。

Note: Photos were taken at 48 h after inoculation.

研究发现, 原核启动子-10 区和-35 区之间的间距一般在 15-20 bp, 间距为 17 bp 时被认为转录效率最高^[20], 且在-10 区和-35 区间存在调节因子可以结合的回文基序。前人在革兰氏阴性细菌中的研究发现, MerR 家族金属响应转录调节因子(metal responsive transcriptional regulator)作用于一些启动子来抑制或激活金属抗性基因的转录, 这些启动子位于基因上游的-10 区和-35 区, 两区之间具有 19-20 bp 的间隔序列^[19], 两区间包含一个蛋白质可以结合的回文基序^[13]。隶属于 MerR 家族的大肠杆菌 K12 的 CueR, 其结合位点(*copA* 的启动子)即具有上述特征, 并且其结合的二元对称序列是连续性的。本研究发现, 与大肠杆菌 K-12 的 *copA* 基因启动子比较, 西瓜食酸菌 *copA* 基因启动子的-10 区和-35 区序列除符合原核基因启动子的特征外, 还表现出其回文基序中二元对称序列为 6 bp 的非连续性序列。已有研究发现, 不同细菌中的回文基序的二元对称序列长度和连续性存在多样性。如, 王冬梅等^[23]研究发现, 淋球菌 *mtrR* 启动子区二元对称序列为连续性的 6 bp 碱基组成; 周日成^[24]研究发现, 玫瑰孢链霉菌 *depR1* 启动子由非连续性的 11 bp 的二元对称序列组成; 王慧^[25]研究发现, 大肠杆菌 K12 中 Fis 识别 8 bp 非连续性的二元对称序列。由此可见, 西瓜食酸菌 *copA* 启动子中回文基序的不同, 即二元对称序列为 6 bp 且非连续, 可能是物种间的差异; 而 AcCueR 与该位点的结合及对 *copA* 的调控仍需进一步的实验验证。通过生物信息学分析比较发现, 西瓜食酸菌 CueR 蛋白及其他物种 CueR 蛋白在分子量、等电点等理化性质上存在差异, 出现这些现象的具体原因尚未可知, 需要进一步的研究解析。

研究发现, 当根据序列或结构信息将某个蛋白质归类到一个超家族, 该蛋白可能具有的功能范围会缩小, 甚至在某些情况下可以精确地确定其功能^[26-27]。在本研究中, AcCueR 与另 4 种 CueR 蛋白均属于 HTH-MerR-SF 超家族, 它们的一级结构

序列、保守结构域等相似但并不完全相同,这可能是导致三级结构不完全相同的原因,但这些差异并不影响它们发挥相似的生物学功能,因为蛋白质的功能主要由其所含有的结构域和三级结构决定。此外, MerR 家族调节蛋白均含有螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix, HTH) 的 DNA 结合序列特点, 该 DNA 结合序列接近蛋白质的 N-端^[13]。本研究中, 5 种 CueR 蛋白均含有 HTH 保守结构域, 说明 CueR 在革兰氏阴性细菌中具有高度的保守性。已有研究发现, 不同细菌中的 CueR 调控的铜稳态相关基因存在相同, 但均调控 P 型 ATP 酶(CopA)。例如, Martell 等^[10]研究发现, 大肠杆菌中 CueR 调控耐铜基因的转录, 包括内膜铜蛋白 ATP 酶基因(*copA*) 和胞质多铜氧化酶基因(*cueO*), 这两种基因产物都有助于将铜从细胞中去除; Quintana 等^[28]研究发现, 在铜绿假单胞菌中, CueR 调控抗铜基因 *copA*、*cusCBA*、*copZ1* 及 *copZ2* 的转录表达; Espariz 等^[29]研究证实, 沙门氏菌中的铜耐受相关组分 P 型 ATP 酶 CopA 和多铜氧化酶 CuiD (沙门氏菌中称为 CuiD) 基因的表达依赖于 CueR 的调控; Marrero 等^[16]研究发现霍乱弧菌的 CopA 和 CueR (CueO 尚不确定) 确实参与了该菌的铜耐受性过程, 且 *copA* 基因的表达被 CueR 激活。这些研究结果显示, 在不同细菌中 CueR 参与调控的铜稳态机制可能不同。本研究中蛋白互作预测显示, 大肠杆菌 EcCueR 与其 CopA 和 CueO 具有互作关系, 这与前人研究结果完全一致^[13]; 与大肠杆菌相似, 西瓜食酸菌 AcCueR 能与该菌的 CopA 和 CueO 发生互作关系; 而进一步的基因沉默和基因功能互补实验证实: 生物信息学筛选得到的 *cueR* 经突变后会导致菌对铜胁迫更加敏感, 互补菌株的铜抗性恢复则验证了该基因为西瓜食酸菌抗铜性相关基因。由此推测, AcCueR 和 大肠杆菌等菌株的 CueR 具有类似的转录调控功能, 在西瓜食酸菌中有关 AcCueR 对 CopA 和 CueO 的作用模式尚需进一步实验探究。

本研究对 *cueR* 基因的生物信息学分析及功能验证, 为进一步研究西瓜食酸菌 CueR 蛋白功能和抗铜机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Niu QW. Research on occurrence rule and control technology of BFB in the process of grafted watermelon seedling production[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
牛庆伟. 西瓜嫁接育苗过程中细菌性果斑病的发生规律及防治技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [2] Deng WL, Huang TC, Tsai YC. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan[J]. Plant Disease, 2010, 94(8): 1065
- [3] Latin RX, Rane KK. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana[J]. Plant Disease, 1990, 74(4): 331
- [4] Somodi GC, Jones JB, Hopkins DL, et al. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida[J]. Plant Disease, 1991, 75(10): 1053-1056
- [5] Liu X. Functional analysis of copper resistance related gene *cusB* in *Acidovorax citrulli*[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2015 (in Chinese)
刘星. 西瓜食酸菌抗铜性相关基因 *cusB* 的功能分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2015
- [6] Hu YH. Molecular analysis of the copper-responsive CopRSCD of a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography), 2009 (in Chinese)
胡永华. 荧光假单胞菌抗铜基因簇的表达调控及其致病性分析[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 2009
- [7] Bahar O, Burdman S. Bacterial fruit blotch: a threat to the cucurbit industry[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2010, 58(1): 19-31
- [8] King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein[J]. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1954, 44(2): 301-307
- [9] Outten FW, Outten CE, Hale J, et al. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(40): 31024-31029
- [10] Martell DJ, Joshi CP, Gaballa A, et al. Metalloregulator CueR biases RNA polymerase's kinetic sampling of dead-end or open complex to repress or activate transcription[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(44): 13467-13472

- [11] Zhao WL. Analysis of copper resistance in *Acidovorax citrulli*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese)
赵文龙. 瓜类细菌性果斑病菌抗铜性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2013
- [12] Li Q. Functional analysis of *CueO* gene in the bacterial fruit blotch of watermelon[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)
李强. 瓜类果斑病菌多铜氧化酶基因 *CueO* 的功能研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2014
- [13] Stoyanov JV, Hobman JL, Brown NL. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(2): 502-512
- [14] Bagchi A. Structural characterizations of metal ion binding transcriptional regulator CueR from opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* to identify its possible involvements in virulence[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(2): 649-656
- [15] Pérez Audero ME, Podoroska BM, Ibáñez MM, et al. Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(4): 853-865
- [16] Marrero K, Sánchez A, González LJ, et al. Periplasmic proteins encoded by VCA0261-0260 and VC2216 genes together with *copA* and *cueR* products are required for copper tolerance but not for virulence in *Vibrio cholerae*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(8): 2005-2016
- [17] Walcott RR, Fessehaie A, Castro AC. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts[J]. *Phytopathology*, 2004, 152(5): 277-285
- [18] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874
- [19] Harley CB, Reynolds RP. Analysis of *E. coli* promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(5): 2343-2361
- [20] Wang XH. The analysis of chemical features in the core promoter of *Escherichia coli*[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2008 (in Chinese)
王晓慧. 大肠杆菌核心启动子的化学特性分析[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2008
- [21] O'Neill MC. *Escherichia coli* promoters. I. Consensus as it relates to spacing class, specificity, repeat substructure, and three-dimensional organization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(10): 5522-5530
- [22] Solioz M. Copper homeostasis in gram-negative bacteria[A]//Solioz M. Copper and Bacteria: Evolution, Homeostasis and Toxicity[M]. Berlin: Springer Press, 2018: 49-80
- [23] Wang DM, Xia ZD, Qi SW, et al. Multiple resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and mutations in the inverted sequence within the *mtrR* promoter region[J]. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 2004, 29(5): 544-547 (in Chinese)
王冬梅, 夏忠弟, 齐素文, 等. 淋球菌 *mtrR* 启动子区域中回文序列基因突变与多重耐药的关系[J]. 中南大学学报: 医学版, 2004, 29(5): 544-547
- [24] Zhou RC. Screening of a transcriptional regulator DepR1 and its regulatory mechanism on daptomycin biosynthesis in *Streptomyces Roseosporus* SW0702[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2015 (in Chinese)
周日成. 玫瑰孢链霉菌 SW0702 中达托霉素生物合成调控因子 DepR1 的筛选与调控机制研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2015
- [25] Wang H. Genome-wide analysis of Fis regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and its regulatory mechanism on pathogenicity islands[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Nankai University, 2013 (in Chinese)
王慧. Fis 蛋白在沙门氏菌中的全局调控网络及其对致病岛的调控机制研究[D]. 天津: 南开大学博士学位论文, 2013
- [26] Peng B. Analysis of the relationship between protein function and conformation[J]. *Farm Products Processing*, 2010(12): 65-66,69 (in Chinese)
彭彬. 蛋白质功能和构象的关系分析[J]. 农产品加工, 2010(12): 65-66,69
- [27] Karplus M, McCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules[J]. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(9): 646-652
- [28] Quintana J, Novoa-Aponte L, Argüello JM. Copper homeostasis networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(38): 15691-15704
- [29] Espariz M, Checa SK, Pérez Audero ME, et al. Dissecting the *Salmonella* response to copper[J]. *Microbiology*, 2007, 153(9): 2989-2997