



辣椒疫霉菌果胶裂解酶 *PL101* 基因的克隆及生物信息学分析

王会征* 兰玉彬

山东理工大学农业工程与食品科学学院 山东 淄博 255000

摘要:【背景】辣椒疫病是一种世界性土传病害,严重影响世界各国辣椒生产,并带来巨大经济损失。果胶裂解酶(pectate lyase, PL)作为一类重要的细胞壁降解酶类是该病的重要致病因子。【目的】对果胶裂解酶基因进行克隆,并对其生物信息学特性进行相关分析,进一步阐明该酶的作用机制。

【方法】根据辣椒疫霉菌全基因组序列,以高致病菌株 SD33 为模板扩增 *PL101* 基因的全长 cDNA 序列,并对其理化性质、跨膜区、亲疏水性、结构域等生物学特性进行分析。【结果】除获得 *PL101* 相关生物学特性信息外,还对 *PL101* 进行三维结构建模,获得可信度较高的蛋白结构,并确定 *PL101* 可能的催化位点为 Asp183、Arg212、Arg272 三个氨基酸。【结论】对 *PL101* 基因的克隆及相关生物学特性的分析为进一步阐明 PL 功能特性提供参考。

关键词: 辣椒疫霉菌, 果胶裂解酶, 克隆, 生物信息学

Cloning and bioinformatics analysis of pectate lyase *PL101* from *Phytophthora capsici*

WANG Hui-Zheng* LAN Yu-Bin

College of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255000, China

Abstract: [Background] *Phytophthora capsici* is a worldwide soil borne disease, which has serious impact on pepper production all over the world and brings huge economic losses. Pectate lyase (PL), as a kind of important cell wall degrading enzymes, is an important pathogenic factor of the disease. [Objective] The gene of *PL* was cloned and its bioinformatics characteristics were analyzed to further elucidate its mechanism. [Methods] According to the whole genome sequence of *P. capsici*, the full-length cDNA of *PL101* gene was amplified with high pathogenic strain SD33 as template, and its physical and chemical properties, transmembrane regions, hydrophobicity, structural domain and other biological characteristics were analyzed. [Results] In addition to the analysis of biological characteristics of *PL101*, the three-dimensional structure modeling of *PL101* was also carried out to obtain protein structure with high reliability, and the possible catalytic sites of *PL101* were determined as Asp183,

Foundation items: Zibo Key Research and Development Program (2019ZBXC053); Zibo Science and Technology Development Program (2018kj010073); Top Talents Program for One Case One Discussion of Shandong Province

*Corresponding author: E-mail: hzwang@sdut.edu.cn

Received: 20-02-2020; Accepted: 23-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 淄博市重点研发计划(2019ZBXC053); 淄博市科技发展计划(2018kj010073); 山东省引进顶尖人才“一事一议”专项经费资助项目

*通信作者: E-mail: hzwang@sdut.edu.cn

收稿日期: 2020-02-20; 接受日期: 2020-04-23; 网络首发日期: 2020-05-09

Arg212 and Arg272 amino acids. **[Conclusion]** The cloning and bioinformatics analysis of PL101 will provide a reference for further elucidating the functional characteristics of PL.

Keywords: *Phytophthora capsici*, Pectate lyase, Cloning, Bioinformatics

我国是世界蔬菜生产和消费第一大国, 蔬菜产业约占农业种植面积的 15%, 产值约占种植业总产值的 35%, 而辣椒种植面积常年稳定在 200 万 hm^2 以上, 占蔬菜种植面积 10% 以上, 是我国最大的蔬菜产业^[1], 保障辣椒等蔬菜供给已成为重大民生问题。然而, 疫病、霜霉病等重大毁灭性卵菌病害因具发病快、危害重、难防难治等特点严重制约着蔬菜产业的健康发展^[2-3]。深入了解疫病等蔬菜卵菌病害的致病机理, 进而从抑制病原菌侵染过程设计新型杀菌剂是植物病理学和农药学科研工作者们面临的迫切任务。

果胶裂解酶(pectate lyase, PL, EC: 4.2.2.2)是植物病原菌关键致病因子, 通过降解寄主细胞壁增强病原菌与寄主的亲和力而引起致病, 在病原菌侵染植物过程中发挥重要作用, 被界定为一种重要的细胞壁降解酶类^[4-6]。PL 广泛存在于植物病原细菌、真菌和线虫等重要有害生物体^[7-8], 研究发现植物病原菌 PL 不仅可降解寄主植物细胞壁成分引起发病, 还能激活寄主免疫防卫系统而抑制病菌侵染致病^[9], 且多基因家族编码的 PL 不同成员间在调控病原菌与寄主互作特性及致病性功能特性上也存在明显分化^[10-11]。因此, 果胶裂解酶功能特性与调控机制研究一直是分子植物病理学关注的热点^[12-13], 对不同 PL 功能特性的研究有助于更好地阐明其功能机制。

PL 存在范围广泛, 然而在辣椒疫病等蔬菜卵菌病害上的研究报道^[14-15] 相对较少。本研究从辣椒疫霉菌高致病菌株上克隆到一个果胶裂解酶基因的全长 cDNA 序列, 并对其进行了相关生物信息学分析, 以期进一步探明果胶裂解酶的性质、结构及功能, 为研究辣椒疫霉菌及植物病原卵菌 PL 致病机制及作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

辣椒疫霉菌高致病性菌株 SD33^[16] 为山东农业大学山东省蔬菜病虫生物学重点实验室分离获得并保存; 克隆载体 pEASY-T3、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及质粒小提试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; rTaq 酶、dNTP、DNA Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司; RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司; 其他试剂及化学药品为国产分析纯。

小型台式高速离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; 电泳仪、凝胶成像分析系统, Bio-Rad 公司; 电热恒温水浴锅、振荡培养箱、电热恒温箱, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

辣椒疫霉菌 SD33 总 RNA 提取参照 Invitrogen TRIzol 试剂说明书进行, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带的完整性。将提取后的 RNA 参照 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书步骤进行反转录, 并将获得的 cDNA 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 *PL101* 基因的克隆

通过对已报道的果胶裂解酶基因氨基酸保守区比对, 以及分析辣椒疫霉菌全基因组(JGI:<http://genome.jgi-psf.org/Phyca11/Phyca11.home.html>) 序列信息获得辣椒疫霉菌一个全长果胶裂解酶基因的序列信息, 以核苷酸序列信息设计引物, 正向引物为 *PL101*-F: 5'-ATGCAGATCTTCCGCGTCGT-3'; 反向引物为 *PL101*-R: 5'-TTAGTTGGACAGGACA CC-3'。以制备好的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 模板 cDNA 0.5 μg , 正、反向引物

(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μL , *rTaq* (2.5 U/ μL) 1 μL , 5 \times Buffer 10 μL , ddH₂O 补至 50 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并回收、纯化目的片段, 回收产物与 pEASY-T3 连接并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 培养、挑选阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序验证。

1.4 *PL101* 基因的生物信息学分析

将测序验证后的 *PL101* 基因序列通过 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行在线分析, 分析其编码蛋白及其重组序列的氨基酸组成、理论分子量、等电点、消光系数、不稳定系数等; 氨基酸序列的信号肽和跨膜区分析分别利用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM Server V2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件进行分析; 利用 ExPASy ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)对该蛋白亲疏水性进行分析; 利用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)对该蛋白的结构域进行分析。

1.5 *PL101* 三维结构建模与分析

利用 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>)对目标蛋白 *PL101* 进行三维结构建模, 选择与目标蛋白一致性最高的序列作为三维结构模板。利用 DNAMAN 软件对目的蛋白质进行序列比对, 用 PyMOL 软件进行特异性结构分析、比较及作图。

2 结果与分析

2.1 *PL101* 基因 cDNA 的 PCR 扩增

辣椒疫霉菌高致病性菌株 SD33 为材料提取总 RNA 反转录获得 cDNA, 经 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测, 获得与预期结果一致的条带(图 1), 大小为 1 203 bp。将回收产物测序验证, 将测序结果与公布的辣椒疫霉菌全基因组 PL 基因(jgi|PhycaF7117743)比对, 发现存在 8 个碱基位点的差异, 翻译成氨基酸后的序列存在 1 个位点的差异, 造成这种

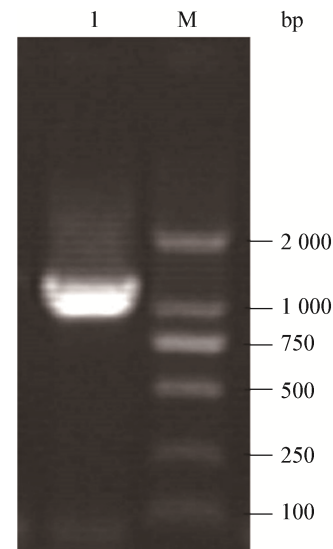


图 1 *PL101* 基因 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of gene *PL101*

注: 1: 扩增的 *PL101* 基因; M: DL2000 DNA Marker.

Note: 1: Amplified *PL101* gene; M: DL2000 DNA Marker.

差异的原因可能是由于不同辣椒疫霉菌株群体的遗传多样性。将克隆到的基因上传 GenBank 数据库, 获得的序列号为 FJ213435。

2.2 *PL101* 基本理化性质分析

辣椒疫霉菌果胶裂解酶基因 *PL101* 序列全长为 1 203 bp, 最大开放阅读框(open reading frame, ORF)长 1 200 bp, ORF 编码一个含 400 个氨基酸残基的蛋白质, 预测编码产物大小约为 42.6 kD, 含 8 个半胱氨酸, 等电点为 9.20。鉴于后续 *PL101* 蛋白表达及纯化的需要, 将带有 6 \times His 标签及相应酶切位点的重组序列 Histag-*PL101* 同时进行基本理化性质分析, ExPASy 分析的 *PL101* 及其重组序列基本理化性质见表 1。

2.3 *PL101* 生物信息学分析

SignalP 5.0 信号肽预测结果显示 *PL101* 有一段长为 22 个氨基酸的信号肽序列, TMHMM Server V2.0 跨膜区预测结果显示该蛋白前 30 个氨基酸为跨膜区, 该区域正是其信号肽所在区域。结合信号肽预测结果, 该蛋白 *PL101* 在胞内产生后分泌到胞外发挥作用。

对 *PL101* 的亲疏水性进行预测, 发现在第

10 位氨基酸处有最强的疏水性, 最大值为 3.311, 在 98 位氨基酸处有最强的亲水性, 最小值为 -2.867, 说明该蛋白为弱亲水性蛋白(图 2)。对蛋白亲疏水性的预测有助于后期蛋白的表达、纯化及其他蛋白生物学相关研究的开展, 尤其是在蛋白质纯化方法上可提供良好的参考。

结构域是蛋白在二级结构或超二级结构的基础上形成的局部折叠区, 有一定的生物学功能, 分析目标蛋白的结构域对蛋白质结构和功能的预测可提供较好的参考。对 PL101 的结构域进行分析, 发现该蛋白属于果胶裂解酶 C 类家族(Pec lyase C) (图 3), 这与之之前报道的真核生物 PL 成员仅分布于 PL1 和 PL3 亚族一致^[17]。但结构域分析没有发现该蛋白的活性位点(图 3), 对其三维结构进行预测进而通过分析确定其活性位点显得尤为重要。

2.4 PL101 蛋白三维结构分析

通过 SWISS-MODEL 建模获得 PL101 三维结构模型(图 4), 其三维结构为典型的平行 β 螺旋结构, 这也是已报道的 PL 结构类型数量最多的一种^[12,14]。其空间结构仅含一个结构域, 主要结构单元为 β 折叠, 这些折叠进一步卷曲成一个右手方向的圆柱体; 除此之外, 结构的 N 端或 C 端呈现大小不等的环状结构(loops) (图 4), 这些环状结构或被于圆柱体内, 或镶嵌于圆柱体外。环状结构大小与构象的不同影响了 PL 催化位点的空间分布及其酶活特性的差异^[18]。

表 1 PL101 基本理化性质

基本理化性质	PL101	Histag-PL101
氨基酸个数 Number of amino acids	400	413
分子量 Molecular weight (kD)	42.6	44.0
理论等电点 Theoretical pI	9.20	9.27
消光系数 Abs	1.109	1.077
半胱氨酸数 Number of Cys	8	8
甲硫氨酸数 Number of Met	6	8
不稳定系数 Instability index	27.58	29.58

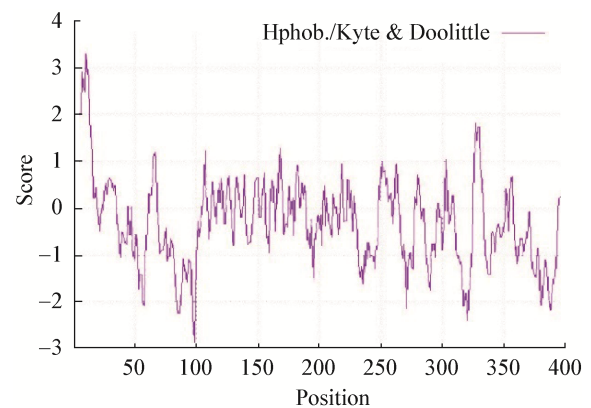


图 2 PL101 亲疏水性预测

Figure 2 Hydrophobicity prediction of PL101

注: 图中横轴代表 PL101 氨基酸位置, 纵轴正值代表疏水性, 正值越大则疏水性越大, 负值代表亲水性, 负值越小则亲水性越大。

Note: The horizontal axis represents the amino acid position of PL101, the vertical axis positive value represents hydrophobicity, the greater the positive value is, the greater the hydrophobicity is, the negative value represents hydrophilicity, and the smaller the negative value is, the greater the hydrophilicity is.

Family		Description		Entry type	Clan	Envelope	
Start	End	From	To	HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites
Pec lyase C		Pectate lyase		Domain	CL0268	102	312
129	312	25	211	211	43.9	2.0e-11	n/a

图 3 PL101 结构域分析

Figure 3 Domain analysis of PL101

注: 结构域分析显示 PL101 为果胶裂解酶 C 类家族, 未发现相关活性位点。

Note: Domain analysis showed that PL101 belongs to Pec lyase C family, and no related active site was found.



图 4 PL101 三维结构预测

Figure 4 Three-dimensional structure prediction of PL101

注: PL101 蛋白结构的氨基端和羧基端分别标示为 N 和 C。

Note: The amino and carboxyl ends of PL101 protein structure were labeled as N and C respectively.

对 PL101 催化位点或活性区域的靶定是结构生物学研究的重点。我们从 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中 70 个 PL 相关蛋白结构中选取一致性相对较高的植物病原真菌黑曲霉属(*Aspergillus niger*) PL 蛋白结构^[19](PDB ID: 1idk)进行比对分析, 虽然 PL101 与 1idk 氨基酸序列一致性仅为 36%, 但二者的蛋白结构叠合(图 5A)高度一致。将 1idk 确定的活性位点 Asp154、Arg176、Arg236 与 PL101 保守位点 Asp183、Arg212、Arg272 氨基酸空间叠合也高度一致(图 5B)。

将 PL101 潜在的活性位点通过同源序列比对发现, 3 个氨基酸均在 PL 保守区即结构域上, 将其所在的 3 段结构域 WGGDAI、IGRQ、GRSP 进行空间定位, 发现这 3 个氨基酸所在的结构域均暴露在三维空间结构表面上(图 6), 而且相互之间形成了一个活性口袋, 为结合底物进而发生催化反应提供了空间条件, 3 段保守结构为果胶裂解酶发生催化反应的重要功能域。

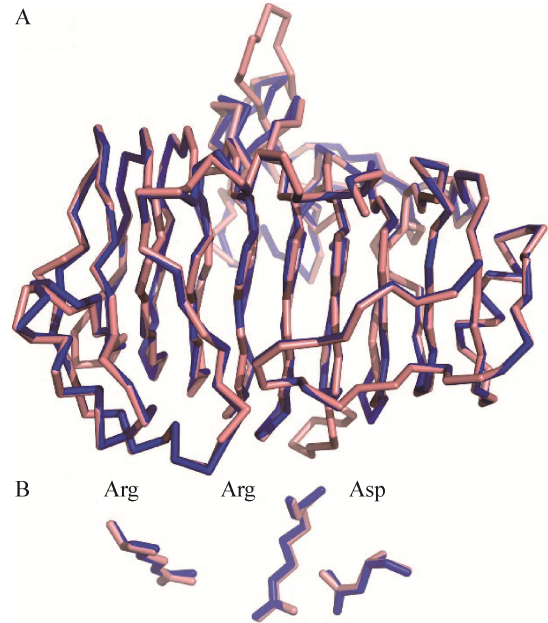


图 5 PL101 三维结构模型与同源结构比对

Figure 5 Three-dimensional structure alignment of PL101 model and its homologous structure

注: A: PL101 与 1idk 结构叠合立体视图。图中 PL101 标记为浅橙色, 1idk 标记为蓝色, 下同; B: PL101 与 1idk 活性位点氨基酸空间叠合立体视图。

Note: A: Stereo view of superposition between PL101 and 1idk. The structures used for the comparisons are colored as follows: PL101, salmon; 1idk, blue; B: Stereo view of superposition of active sites between PL101 and 1idk.

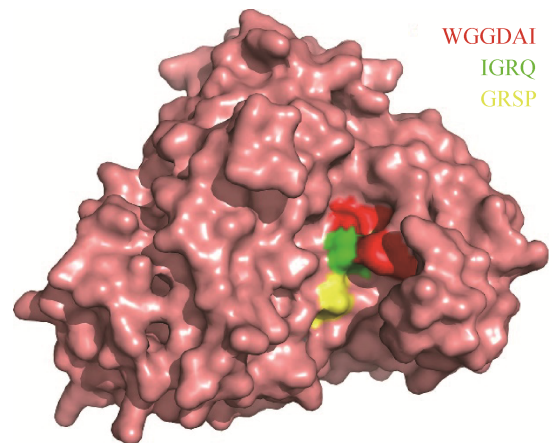


图 6 PL101 潜在重要功能域空间定位

Figure 6 Location of the potentially important functional domains of PL101

注: PL101 三段重要结构域 WGGDAI、IGRQ、GRSP 分别用红色、绿色、黄色标识和区分。

Note: The three important functional domains WGGDAI, IGRQ and GRSP of PL101 are identified and distinguished by red, green and yellow respectively.

3 讨论与结论

由辣椒疫霉菌(*Photophthora capsici* Leonian)引起的辣椒疫病素有辣椒“癌症”之称,是一种全世界普遍发生的毁灭性土传病害,严重制约了辣椒产业健康发展^[20],而传统的使用化学杀菌剂进行防治的方法会产生药剂残留及环境污染等问题,且疫霉菌易产生抗药性^[21-22]。对引起该病的重要细胞壁降解酶类果胶裂解酶(pectate lyase, PL)的研究,尤其是对该类蛋白活性位点的靶定有助于明确该酶致病机理,进而为设计新型杀菌剂作用靶标奠定基础。

本研究通过分析辣椒疫霉菌全基因组序列,从辣椒疫病高致病菌株克隆到一个全长 *PL101* 基因,虽与公布的基因组序列存在微小差异,但并不影响基因的功能特性。序列上的差异可能是由于测序菌株与本试验所用菌株不同^[23],而不同辣椒疫霉菌株群体具有较丰富的遗传多样性,这与之前报道的辣椒疫霉菌株群体的遗传多样性和多基因型现象^[24]一致。经过序列比对及结构分析,存在差异的氨基酸并不在 PL 功能域及活性中心上,而蛋白质功能特性均通过其肽链上特定氨基酸功能基团实现。

作为病原菌侵染寄主过程中分泌的细胞壁降解酶,PL 被界定为辣椒疫霉菌的重要致病酶类^[5]。PL 不但来源广泛,其酶活及功能特性也存在明显分化,主要原因是 PL 基因家族及个体成员众多,多序列比对发现该家族氨基酸序列一致性较低(<30%),已报道的 PL 功能特性差异显著^[25-26],对源于 *P. capsici* 上的一个 PL 基因 *PL101* 理化性质及相关生物信息学的分析有助于今后对其开展遗传学尤其是酶学特性的相关研究。除对该基因进行常规理化性质分析外,我们将带有 6×His 标签及相应酶切位点的重组序列 Histag-PL101 同时进行基本理化性质分析,这也是蛋白纯化最常用的亲和标签。PL101 加上 6×His 标签后不稳定系数增大,结合生物信息学分析结果(疏水性分析)发现该蛋白可能稳定性较差,重组蛋白较难纯化。

基因转录、翻译形成的蛋白空间结构是功能基

因编码的蛋白质行使生物功能的基础,蛋白质各种功能特性均受其空间结构的调控,不同功能基因均编码特异空间结构的蛋白质,由此决定了生命现象的多样性。因此,立足蛋白结构生物学研究更易于探明特异功能基因遗传本质与调控机理。截至目前,蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB)积累了 70 个植物病原菌 PL 三维结构,可划分为平行 β 螺旋^[14]、 $(\alpha/\alpha)_7$ 桶状^[27]、紧密 $(\alpha/\alpha)_3$ 桶状^[28] 结构 3 种类型。这些已解析的 PL 三维结构有 66 个来自植物病原细菌,仅一个 PL 三维结构来自于植物病原真菌黑曲霉属^[19],若干 PL 三维结构及其催化机制的多样性引起了植物病理学家浓厚的兴趣与关注,但始终缺乏重要病原卵菌——疫病菌等病菌的 PL 三维结构相关资料与积累。利用现有的 PL 结构,结合氨基酸序列比对、重要结构域与功能域定位及三维建模手段获得目的蛋白的可信蛋白结构不失为一种快速、便捷的方法。

常见的生物信息学分析多集中于目的基因的理化性质、结构域、功能域或系统进化等方面^[29],或者仅仅是对目的序列进行三维建模,但缺少依据结构获得重要催化位点或相关功能机制分析等^[30]。本研究通过同源序列比对、三维结构建模、同源结构及保守域空间叠合等方法获得 PL101 可信度较高的三维结构模型,并初步确定其功能域及催化位点,为深入阐明植物病原卵菌与寄主互作过程中 PL 功能特性及分子机制提供了极有价值的参考。同时,确定的催化位点可以为设计新型分子靶标药物提供参考^[31],进而为植物病原卵菌病害的防控策略制定提供新思路。在后续实验中我们将通过对 PL101 关键活性位点的定点突变、突变体表达、蛋白纯化、酶活测定及接种试验等进行验证,在更好地丰富 PL 功能机制的同时验证此分析方法的可行性及准确度。

REFERENCES

- [1] Zheng JY, Li XF, Liu F, et al. The research progresses on pepper in 2018[J]. Journal of China Capsicum, 2019, 17(1): 1-9,17 (in Chinese)

- 郑井元, 李雪峰, 刘峰, 等. 2018 年辣椒科学研究进展[J]. 辣椒杂志, 2019, 17(1): 1-9,17
- [2] Liu RY, Miao W, Dong YJ, et al. Efficacy of REMEDIER and azoxystrobin on pepper *Phytophthora* blight[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2018(10): 74-76 (in Chinese)
刘荣云, 缪武, 董亚静, 等. 生物杀菌剂 REMEDIER 与啮菌酯混配对辣椒疫病的防治效果[J]. 湖南农业科学, 2018(10): 74-76
- [3] Chen YM, Gu LL, Lin SX, et al. Cucumber downy mildew: research progress and registered fungicides[J]. Journal of Agriculture, 2018, 8(8): 9-15,100 (in Chinese)
陈永明, 谷莉莉, 林双喜, 等. 黄瓜霜霉病的研究进展及登记防治农药的分析[J]. 农学学报, 2018, 8(8): 9-15,100
- [4] Gao F, Yue HD, Qin XM, et al. Research advances on cell wall degrading enzymes produced by pathogenic *Fusarium* causing plant diseases[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(4): 955-960 (in Chinese)
高芬, 岳换弟, 秦雪梅, 等. 植物致病镰刀菌细胞壁降解酶的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 955-960
- [5] Xue CS, He RH, Xiao SQ, et al. Kinds and activity of cell wall degrading enzymes produced from *Phytophthora capsici*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2016, 47(1): 8-12 (in Chinese)
薛春生, 何瑞珏, 肖淑芹, 等. 辣椒疫霉菌细胞壁降解酶种类与活性分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2016, 47(1): 8-12
- [6] Kikot GE, Hours RA, Alconada TM. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 231-241
- [7] Chang SC, Deng WL, Huang HC, et al. Differential expression of pectolytic enzyme genes in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and demonstration that pectate lyase pel3 is required for the formation of citrus canker[J]. Microbiological Research, 2016, 192: 1-10
- [8] Saoudi B, Habbeche A, Kerouaz B, et al. Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from *Actinomadura keratinilytica* Cpt20[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(12): 2259-2266
- [9] Fagard M, Dellagi A, Roux C, et al. *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(7): 794-805
- [10] Kumar S, Jain KK, Singh A, et al. Characterization of recombinant pectate lyase refolded from inclusion bodies generated in *E. coli* BL21(DE3)[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 110: 43-51
- [11] Wang XW, Lu ZH, Xu T, et al. Improving the specific activity and thermo-stability of alkaline pectate lyase from *Bacillus subtilis* 168 for bioscouring[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 129: 74-83
- [12] Cohen FE. The parallel β helix of pectate lyase C: something to sneeze at[J]. Science, 1993, 260(5113): 1444-1445
- [13] Ali S, Søndergaard CR, Teixeira S, et al. Structural insights into the loss of catalytic competence in pectate lyase activity at low pH[J]. FEBS Letters, 2015, 589(21): 3242-3246
- [14] Kim CY, Mosser V, Keen N, et al. Preliminary crystallographic analysis of a plant pathogenic factor: Pectate lyase[J]. Journal of Molecular Biology, 1989, 208(2): 365-367
- [15] Jia YJ, Feng BZ, Sun WX, et al. Polygalacturonase, pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsici* incubated under different conditions[J]. Journal of Phytopathology, 2009, 157(10): 585-591
- [16] Sun WX, Zhang XG. Pathogenicity differentiation and DNA polymorphism of *Phytophthora capsici* from different areas in China[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2008, 5(3): 41-44,62 (in Chinese)
孙文秀, 张修国. 不同地区辣椒疫霉致病力分化及其 DNA 多态性分析[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2008, 5(3): 41-44,62
- [17] Lombard V, Bernard T, Rancurel C, et al. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics[J]. Biochemical Journal, 2010, 432(3): 437-444
- [18] Lietzke SE, Yoder MD, Keen NT, et al. The three-dimensional structure of pectate lyase E, a plant virulence factor from *Erwinia chrysanthemi*[J]. Plant Physiology, 1994, 106(3): 849-862
- [19] Mayans O, Scott M, Connerton I, et al. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases[J]. Structure, 1997, 5(5): 677-689
- [20] Li P, Ye T, Zheng T, et al. Analysis of the soluble protein and esterase isozyme of *Phytophthora capsici* Leonian[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2015, 42(6): 915-920 (in Chinese)
李萍, 叶涛, 郑婷, 等. 辣椒疫霉可溶性蛋白和酯酶同工酶电泳分析[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(6): 915-920
- [21] Zhai MT, Wang KY, Xu H, et al. Induction and characteristics of *Phytophthora capsici* isolates resistant to fluopicolide[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(1): 88-96 (in Chinese)
翟明涛, 王开运, 许辉, 等. 抗氟吡菌胺辣椒疫霉菌株的诱导及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 88-96
- [22] Hao N, Tong ZH, Qiu DW. Isolation of *Brevibacillus laterosporus* A60 and its greenhouse control efficiency against *Phytophthora capsica*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(9): 160-165 (in Chinese)
郝楠, 仝赞华, 邱德文. 侧孢短芽孢杆菌 A60 的筛选及其对辣椒疫霉的室内防效测定[J]. 生物技术通报, 2017,

- 33(9): 160-165
- [23] Wang HZ, Lan YB. Prokaryotic expression, purification and crystallization of glucanase inhibitor protein (GIP) from *Phytophthora capsica*[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2019, 51(10): 111-116 (in Chinese)
王会征, 兰玉彬. 辣椒疫霉菌葡聚糖酶抑制蛋白的原核表达、纯化及结晶[J]. 山东农业科学, 2019, 51(10): 111-116
- [24] Sun WX, Zhang XG, Jia YJ, et al. Phylogenetic analysis among isolates of *Phytophthora capsici* from different areas by RAPD[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(4): 340-344 (in Chinese)
孙文秀, 张修国, 贾永健, 等. 不同地区辣椒疫霉菌遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 340-344
- [25] Tyler BM, Tripathy S, Zhang XM, et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis[J]. Science, 2006, 313(5791): 1261-1266
- [26] Sassi AH, Trigui-Lahiani H, Abdeljalil S, et al. Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium occitanis* expressed in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 256-262
- [27] van Petegem F, Contreras H, Contreras R, et al. *Trichoderma reesei* α -1, 2-mannosidase: structural basis for the cleavage of four consecutive mannose residues[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 312(1): 157-165
- [28] Charnock SJ, Brown IE, Turkenburg JP, et al. Convergent evolution sheds light on the anti- β -elimination mechanism common to family 1 and 10 polysaccharide lyases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(19): 12067-12072
- [29] Li YF, Lin L, Xuan MR, et al. Bioinformatic analysis of Argonaute family genes in oomycetes and fungi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(1): 60-67 (in Chinese)
李喻菲, 林龙, 宣铭润, 等. 卵菌与真菌 Argonaute 家族基因的生物信息学分析[J]. 植物病理学报, 2020, 50(1): 60-67
- [30] Li BY, Li QQ, Gong SM, et al. Cloning and bioinformatics analysis of nucleoside diphosphate kinase gene from *Rehmannia glutinosa*[J]. Guihaia, 2020, 40(4): 492-500 (in Chinese)
李冰怡, 李谦谦, 宫世萌, 等. 地黄核苷二磷酸激酶基因的克隆及生物信息学分析[J]. 广西植物, 2020, 40(4): 492-500
- [31] Duan WQ, Song H, Wang HY, et al. The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets[J]. The EMBO Journal, 2017, 36(7): 919-933