

研究报告

Research Report

三种常见假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA-G 的生物信息学比较分析

吴倩¹ 张昭寰^{1,2*} 黄振华¹ 刘静¹ 潘迎捷^{1,3,4} 赵勇^{1,3,4*}

1 上海海洋大学食品学院, 上海, 201306; 2 上海海洋大学水产与生命学院, 上海, 201306; 3 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海, 201306; 4 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海, 201306

* 共同通信作者, zh-zhang@shou.edu.cn; yzhao@shou.edu.cn

摘要 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)及恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)是重要的致病菌与腐败菌, 极易形成生物被膜, 对人类健康和食品质量安全造成了严重的危害。Pel 胞外多糖是假单胞菌(*Pseudomonas*)生物被膜的重要组成部分, 通过相应的 Pel 系统进行合成和转运。运用生物信息学分析技术对 Pel 系统相关蛋白进行分析, 有助于更好地理解假单胞菌生物被膜的形成机制。本研究以 3 种常见假单胞菌为研究对象, 通过生物信息学分析技术, 结合 ExPASy 在线工具、SignalP 4.0 Server、TMHMM-2.0、Phyre2 等软件, 分析了 3 种假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA-G 的理化性质、信号肽、跨膜区域以及三级结构和功能。结果表明, 除 PelE 和 PelG 蛋白的理论等电点存在差异外, 3 种假单胞菌 Pel 系统的理化性质基本相同。荧光假单胞菌 PelA 蛋白不含跨膜区, 铜绿假单胞菌 PelE 蛋白比另外两种菌多 1 段跨膜区, 其他蛋白的跨膜区不存在明显差异。同源建模结果表明, 3 种菌 PelA-G 蛋白的折叠方式相同, 三维结构能够高度重合, 推测它们在 Pel 胞外多糖转运过程中发挥着相同的功能。本研究从生物信息学的角度揭示了 3 种假单胞菌 Pel 系统结构和功能上的共性, 为该系统转运机制的进一步研究提供重要的数据基础。

关键词 假单胞菌; Pel 胞外多糖转运系统; 生物信息学分析; 蛋白三级结构与功能

Bioinformatics Comparative Analysis of Proteins PelA-G Associated with Exopolysaccharide Transport System in Three Common *Pseudomonas*

Wu Qian¹ Zhang Zhaohuan^{1,2*} Huang Zhenhua¹ Liu Jing¹ Pan Yingjie^{1,3,4} Zhao Yong^{1,3,4*}

1 College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2 College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 3 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai, 201306; 4 Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306

* Co-corresponding authors, zh-zhang@shou.edu.cn; yzhao@shou.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.040.003115

Abstract *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas putida* are important pathogenic and spoilage bacteria that can easily form biofilms causing serious harm to human health and food safety. Pel is an important component in the *Pseudomonas* biofilm and translocation of it is proposed to occur via Pel exopolysaccharide transport system. Analyzing proteins by bioinformatics in the Pel system contribute to understand the formation mechanism of *Pseudomonas* biofilm betterly. In the study, we analyzed the physicochemical properties, signal peptides, transmembrane region and tertiary structure of PelA-G proteins of the Pel exopolysaccharides transport system in three *Pseudomonas* species by ExPASy, SignalP 4.0 Server, TMHMM-2.0 and Phyre2. The results

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(32001800)和国家博士后创新人才支持计划(BX20190194)共同资助

引用格式: Wu Q., Zhang Z.H., Huang Z.H., Liu J., Pan Y.J., and Zhao Y., 2021, Bioinformatics comparative analysis of proteins PelA-G associated with exopolysaccharide transport system in three common *Pseudomonas*, Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 40(9-10 combined issue): 3115-3123. (吴倩, 张昭寰, 黄振华, 刘静, 潘迎捷, 赵勇, 2021, 三种常见假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA-G 的生物信息学比较分析, 基因组学与应用生物学, 40(第 9-10 期合刊): 3115-3123.)

showed that the physicochemical properties of PelA-G proteins were almost the same in three *Pseudomonas* Pel systems, except the theoretical isoelectric points of PelE and PelG proteins. *P. aeruginosa* PelA protein does not contain a transmembrane region, and its PelE protein has one more transmembrane region compared to the other two strains. Three strains had the same folding pattern and the three-dimensional structure could be highly overlapping by homologous modeling, suggesting that they played the same function in the transport process of Pel exopolysaccharides. This study revealed the similarities in structure and function of three *Pseudomonas* Pel systems by bioinformatics and provided an important data basis for the further study on this transport system.

Keywords *Pseudomonas*; Pel exopolysaccharide transport system; Bioinformatics analysis; Tertiary structure and protein function

假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)属于需氧型革兰氏阴性细菌,具有极其丰富的代谢类型,可广泛存在于水源、土壤以及各类食品之中。该菌属中已知的物种有 190 余种,其中至少有 10 余种能够导致人类或动物患病,对人类健康与食品质量安全危害最为严重的种类包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)及恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等(Wiens et al., 2014; Xu et al., 2017; Liu et al., 2021)。生物被膜(Biofilm)被定义为“微生物的聚集体”,是由细菌及其胞外聚合物组成的多细胞群体(Costerton et al., 1999)。假单胞菌极易形成生物被膜,被视为生物被膜研究的模式菌株(Fux et al., 2005)。其生物被膜的主要成分为胞外多糖、蛋白质和核酸,这些成分决定了生物被膜的结构组成和功能(Siriken et al., 2021)。其中,胞外多糖是假单胞菌生物被膜最为重要的组成部分,能增强菌体对外界环境、抗菌剂和宿主防御的耐受性(Flemming and Wingender, 2010)。

假单胞菌能产生 3 种不同的胞外多糖: Pel、Psl 以及褐藻胶(Ryder et al., 2007)。其中, Pel 是一种由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖和 N-乙酰基-D-半乳糖胺组成的阳离子胞外多糖,是假单胞菌生物被膜形成必不可少的成分,与该菌生物被膜厚度、粘附性和细胞聚集性密切相关(Jennings et al., 2015)。参与 Pel 多糖生物合成和释放过程的系统主要由 PelA-G 7 个蛋白构成,包括存在于细胞周质空间中的伴侣蛋白 PelA(王帅涛等, 2021)、细胞外膜上的 PelB(Marmont et al., 2017a)、连接细胞内外膜的转运通道 PelC 和 PelE(Whitfield et al., 2020)、细胞内膜上的 PelD(Whitney et al., 2012)和 PelG(Franklin et al., 2011),以及位于细胞内的 PelF(Franklin et al., 2011)。现阶段,关于 Pel 系统的研究大多聚焦于铜绿假单胞菌(Colvin et al., 2012),目前仅有 PelA 糖苷水解酶域、PelC、PelB 周质域和 PelD 胞质域的结构被解析(Whitney et al., 2012; Marmont et al., 2017a),仅有 PelA 糖苷水解酶域和脱乙酰

酶域的部分功能被揭示(Colvin et al., 2013; Baker et al., 2016),对于整个 Pel 系统结构与功能的全面研究尚属空白,对于其他假单胞菌 Pel 系统的研究也未见报道,这大大限制了人们对于该系统的认知和理解。

合理运用生物信息学分析技术对多种假单胞菌 Pel 系统相关蛋白的异同点进行比较分析,有助于更好地理解该菌 Pel 胞外多糖转运的过程与机制,以服务于假单胞菌生物被膜形成机制的研究。因此,本研究以 3 种常见且危害较大的假单胞菌(铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌)为研究对象,应用生物信息学技术,对它们的 Pel 胞外多糖转运系统中 7 个相关蛋白 PelA-G 的理化性质、信号肽和跨膜区域进行了探究,并根据 Phyre2 在线分析软件揭示了各蛋白的结构与功能,为后续 PelA-G 蛋白的表达纯化、结构解析、转运功能研究提供参考依据,为假单胞菌生物被膜形成机制的进一步揭示提供可靠的数据支撑。

1 结果与分析

1.1 理化性质分析

本研究使用 ExPASy 分析了铜绿假单胞菌 PA14、荧光假单胞菌 NBRC15842 和恶臭假单胞菌 JBC17 的 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA、PelB、PelC、PelD、PelE、PelF 和 PelG 的理化性质。

铜绿假单胞菌的 PelA-G 蛋白的相对分子质量分别约为 105、135、19、51、37、57、52 kD。荧光假单胞菌的 PelA-G 蛋白的相对分子质量分别约为 104、135、19、50、36、57、52 kD。恶臭假单胞菌的 PelA-G 蛋白的相对分子质量分别约为 105、136、19、50、36、56、52 kD(图 1A)。

3 种假单胞菌 Pel 系统相关蛋白理化性质基本相同: PelA 均为碱性亲水蛋白, PelB 和 PelC 均为酸性亲水蛋白, PelD 均为酸性疏水蛋白, PelF 均为酸性亲水蛋白。但是, PelE 和 PelG 蛋白的理论等电点存在差异,而铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌的 PelE 为碱性

疏水蛋白,而恶臭假单胞菌的 PelE 为酸性疏水蛋白;铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌的 PelG 为碱性疏水蛋白,而荧光假单胞菌的 PelG 为酸性疏水蛋白(图 1B)。此外,3 种假单胞菌 Pel 系统相关蛋白的摩尔吸光系数基本相同(图 1C)。

1.2 信号肽和跨膜区分析

本研究进一步比较了 3 种常见假单胞菌的 Pel

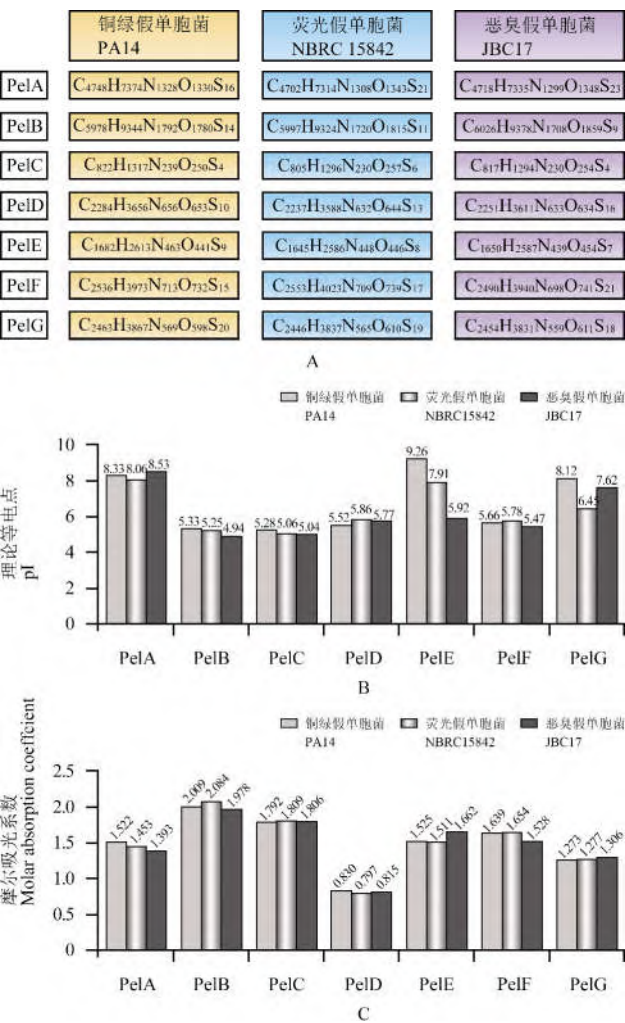


图 1 3 种假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的理化性质分析

注: A: 化学式; B: 理论等电点; C: 摩尔吸光系数; 橙色: 铜绿假单胞菌 PA14; 蓝色: 荧光假单胞菌 NBRC15842; 紫色: 恶臭假单胞菌 JBC17

Figure1 Physical and chemical properties of Pel extracellular polysaccharide transport system interacting protein in three common *Pseudomonas*

Note: A: Chemical formula; B: Isoelectric point; C: Molar absorption coefficient; Orange: *Pseudomonas aeruginosa* PA14; Blue: *Pseudomonas fluorescein* NBRC15842; Purple: *Pseudomonas putida* JBC17

胞外多糖转运系统相关蛋白的信号肽及跨膜区的差异。结果表明,铜绿假单胞菌 PelA-G 蛋白的信号肽切割位点分别为 35、37、8、27、12、2、16 (表 1); 荧光假单胞菌 PelA-G 蛋白的信号肽切割位点分别为 21、4、6、31、11、4、28; 恶臭假单胞菌 PelA-G 蛋白的信号肽切割位点分别为 21、30、3、66、11、54、16。其信号肽的序列比对结果显示(图 2),3 种假单胞菌 PelA 蛋白信号肽序列的相似度为 41.9%,PelB-G 蛋白的信号肽序列存在高度相似性。3 种假单胞菌 Pel 系统相关蛋白的跨膜区分布具有一定程度的相似性: 它们的 PelB、PelD 和 PelG 蛋白分别存在 1 个、3 个和 12 个跨膜区域,PelC 和 PelF 蛋白均不存在跨膜区域(表 2)。不同之处在于:铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌的 PelA 蛋白存在 1 个跨膜区域,分别位于 27~49 位和 13~35 位氨基酸处,荧光假单胞菌的 PelA 蛋白不存在跨膜区域。此外,铜绿假单胞菌 PelE 蛋白存在 3 个跨膜区域,而荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌的 PelE 蛋白存在 2 个跨膜区域。

1.3 三级结构预测分析

通过对 3 种假单胞菌的 PelA-G 蛋白序列进行比对,发现它们序列的相似性分别为 75.51%、66.89%、80.73%、74.15%、77.60%、78.45%、88.23%,表明 3 种假单胞菌 PelA-G 蛋白序列的相似度较高,可通过结构预测进行综合比较分析,以揭示 3 种菌 Pel 系统结构与功能的共性,并为后续 Pel 系统的结构解析提供重要的数据支撑。因此,本研究进一步运用 Phyre2 对 3 种假单胞菌的 PelA-G 蛋白三级结构进行预测(图 3)。

PelA 为 Pel 胞外多糖转运系统的伴侣蛋白,3 种假单胞菌的 PelA 蛋白均含两个结构域:N 端的糖苷水解酶域与 C 端的脱乙酰酶域。其 N 端的糖苷水解酶域,以铜绿假单胞菌 PAO1 糖苷水解酶域的结构[PDB:5tc b]为模板进行同源建模,序列相似度分别为 100%、65%和 66%。C 端的脱乙酰酶域,以幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)肽聚糖脱乙酰酶域的结构[PDB:3qbu]为模板进行同源建模,序列相似度分别为 15%、19%和 16%。

PelB 和 PelC 为 Pel 胞外多糖转运系统的外膜蛋白,3 种假单胞菌的 PelB 蛋白均含两个结构域:N 端的水解酶域和 C 端的 β -桶状结构。其 N 端的水解酶域,以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ski2-3-8 复合体的结构[PDB:4buj]为模板进行同源建模,序列相似度分别为 14%、11%和 10%。C 端为典型的 β -桶状结构,以细菌纤维素合酶外膜通道 BcsC 蛋白的结构[PDB:6tzk]为模板进行同源建模,相似度分别为

表 1 3 种常见假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的信号肽切割位点
Table1 Signal peptide cleavage sites of proteins associated with the extracellular polysaccharide transport system in three common *Pseudomonas*

蛋白	铜绿假单胞菌 PA14	荧光假单胞菌 NBRC15842	恶臭假单胞菌 JBC17
Protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC15842	<i>Pseudomonas putida</i> JBC17
PelA	35	21	21
PelB	37	4	30
PelC	8	6	3
PelD	27	31	66
PelE	12	11	11
PelF	2	4	54
PelG	16	28	16

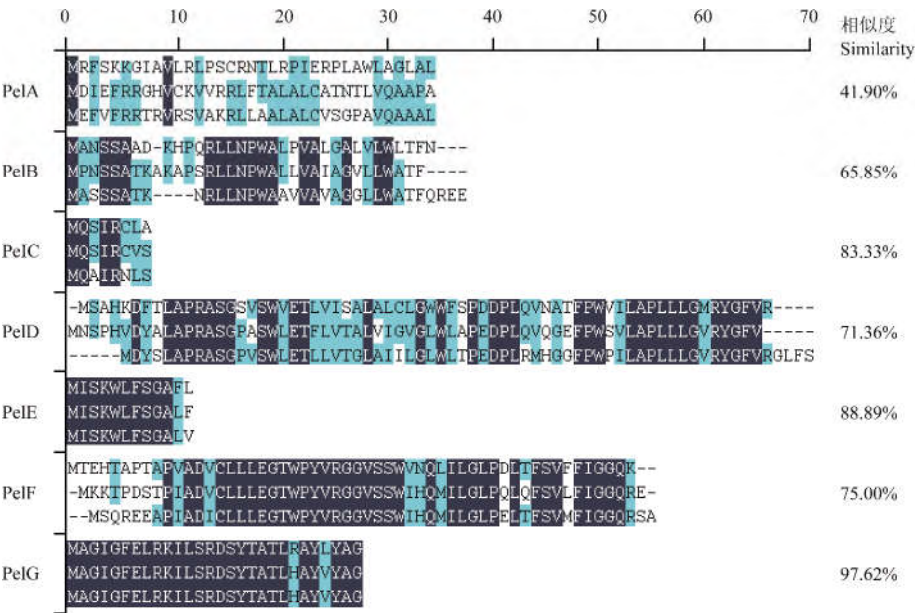


图 2 3 种假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的信号肽序列比对分析

注: 深蓝色: 同源性水平 $\geq 75\%$; 蓝绿色: 同源性水平 $\geq 50\%$

Figure 2 Alignment analysis of signal peptide sequence of Pel extracellular polysaccharide transport system interacting protein in three common *Pseudomonas*

Note: Dark blue: Homology level $\geq 75\%$; Turquoise: Homology level $\geq 50\%$

12%、11%和 13%。Marmont 等(2017b)的研究表明PelB 的 N 端含 19 个连续的 TPR 结构基序, 可作为该系统中其余蛋白的结构支架。3 种假单胞菌的 PelC 均不包含可识别的结构域, 以金属还原土杆菌(*Geobacter metallireducens*) PelC 蛋白的结构[PDB:5t0z]为模板进行同源建模, 相似度分别为 37%、37%和 36%。

PelD、PelE 和 PelG 为 Pel 胞外多糖转运系统的内膜蛋白, 3 种假单胞菌的 PelD 蛋白均含 1 个结构域, 以铜绿假单胞菌 PAO1 的 PelD 蛋白胞质域的晶体结构[PDB:4euv]为模板进行同源建模, 相似度分别为 99%、59%和 57%。3 种假单胞菌的 PelE 蛋白均含 1 个结构域, 以大肠杆菌 BepA 蛋白的晶体结构(PDB:

6ait)为模板进行同源建模, 相似度分别为 13%、15%和 14%。3 种假单胞菌的 PelG 蛋白含 1 个结构域, 以霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) NorM 蛋白的晶体结构[PDB:3mku]为模板进行同源建模, 相似度均为 14%。

PelF 位于假单胞菌内膜内侧, 3 种假单胞菌的PelF 蛋白均含 1 个 GT-B 折叠的糖基转移酶 GT4 家族结构域, 以拟南芥蔗糖合酶 1 的晶体结构[PDB:3s29]为模板进行同源建模, 相似度分别为 16%、16%和 18%。

2 讨论

生物信息学是一种高效的蛋白研究方法(童金蓉等, 2020), 能分析蛋白的理化性质、信号肽、跨膜区和

表 2 3 种常见假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的跨膜区域预测

Table2 Transmembrane region prediction of proteins associated with the extracellular polysaccharide transport system in three common *Pseudomonas*

蛋白	铜绿假单胞菌 PA14	荧光假单胞菌 NBRC15842	恶臭假单胞菌 JBC17
Protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC15842	<i>Pseudomonas putida</i> JBC17
PelA	27~49	0	13~35
PelB	13~35	20~37	12~34
PelC	0	0	0
PelD	13~35, 62~81, 88~110	16~38, 58~80, 87~109	12~34, 54~76, 88~110
PelE	5~27, 31~53, 66~88	31~53, 66~88	31~53, 66~88
PelF	0	0	0
PelG	25~47, 62~84, 105~127, 137~156, 163~185, 189~208, 228~245, 268~290, 337~359, 365~387, 394~416, 420~442	25~47, 62~84, 104~126, 130~152, 159~181, 186~208, 228~245, 268~290, 330~352, 365~387, 394~416, 421~443	25~47, 62~84, 105~127, 132~154, 159~181, 186~208, 228~245, 268~290, 330~350, 365~387, 394~416, 420~437

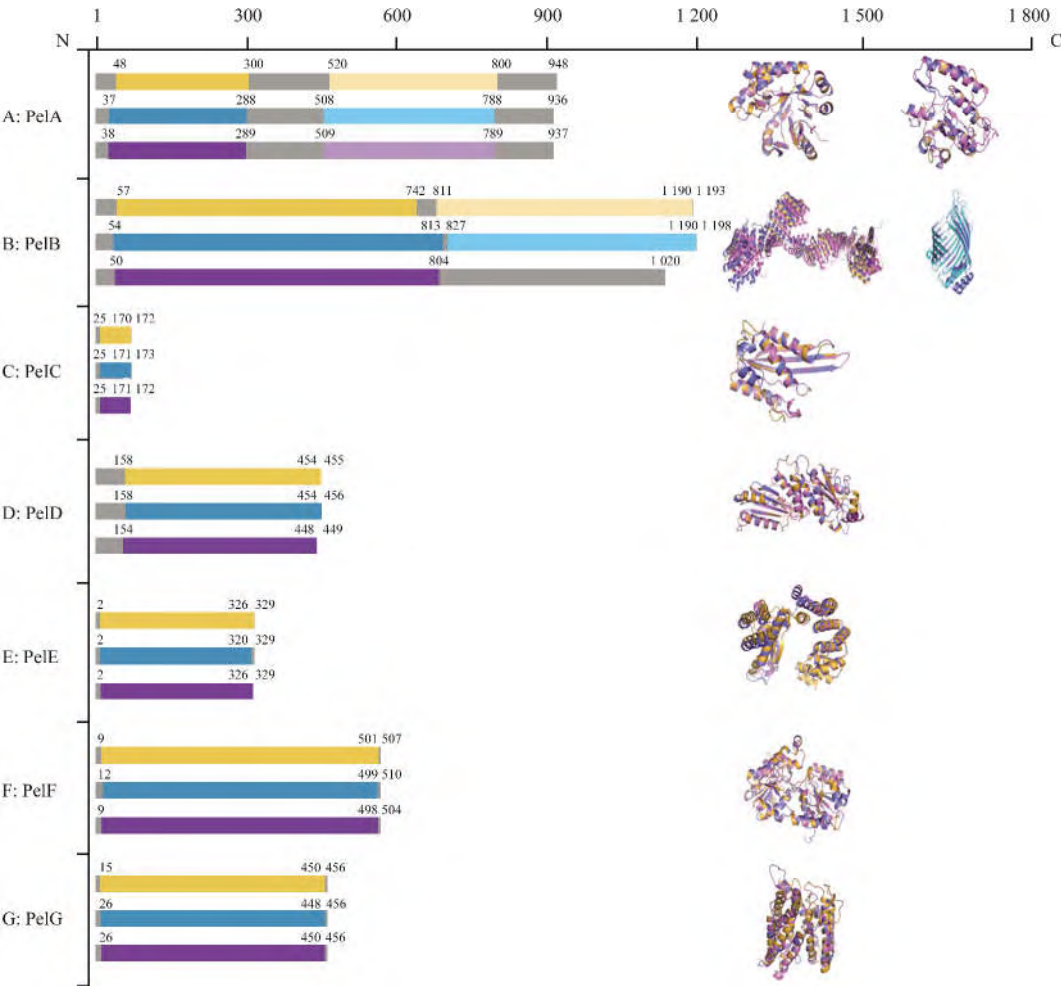


图 3 3 种常见假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的三级结构

Figure 3 Tertiary structure of Pel exopolysaccharide transport system relative protein in three common *Pseudomonas*

蛋白质的结构等，通过分析预测的结果可为后续蛋白的结构和功能研究提供数据基础和科研思路(曹晓宇等, 2020)。本研究首先分析了 3 种假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA-G 的理化性质、信号

肽和跨膜区分布。结果表明,除 PelE 和 PelG 蛋白的理论等电点存在差异外,3 种假单胞菌 Pel 系统的理化性质基本相同。荧光假单胞菌 PelA 蛋白不含跨膜区,铜绿假单胞菌 PelE 蛋白比另外两种菌多 1 段跨膜

区,其他蛋白的跨膜区不存在明显差异。明晰这些蛋白的理化性质、信号肽与跨膜区位置(王永刚等, 2018),有助于后续 PelA-G 重组蛋白表达载体的设计和提取纯化方式的选择,以更好地服务这些蛋白结构和功能的研究(Kubicek et al., 2014)。

本研究进一步分析了 PelA-G 蛋白的三维结构和功能,对其转运过程进行了全面的总结(图 4)。Pel 胞外多糖在假单胞菌的胞内形成,通过 Pel 系统转运至外膜外侧,成为该菌生物被膜构筑的核心骨架。位于 3 种假单胞菌胞内的 PelF 蛋白,含有 1 个 GT-B 折叠的糖基转移酶 GT4 家族结构域(图 3F),可以转移 UDP、ADP、GDP 或 CMP 连接糖,推测 PelF 蛋白具有糖基转移酶活性(Zheng et al., 2011)。

在细胞内膜上,3 种假单胞菌的 PelD 蛋白均含有 1 个 GGDEF 域(图 3D),在该结构域中含 1 个 RX-XD 基序,可作为与环二鸟苷酸(c-di-GMP) 特异性结合的受体(Whitney et al., 2012),调节假单胞菌 Pel 胞外多糖的产生。PelE 蛋白中存在多个 TPR 基序(图 3E),该基序是一个含有 34 个氨基酸的重复序列,在大型蛋白复合物组装中起着重要作用 (Shahrizal et al., 2019),促进内膜复合物 PelDEG 的组装。PelG 蛋白含有 1 个与 NorM 蛋白相似的结构域(图 3G),是多药和有毒复合挤压(MATE) 蛋白家族的成员(喻丝丝等, 2014),推测其可能在 Pel 多糖通过内膜出口中发挥作用(He et al., 2010)。

在周质空间中,3 种假单胞菌的 PelA 蛋白均含 2 个结构域:N 端的糖苷水解酶域与 C 端的脱乙酰酶域(图 3A)。由此推测,3 种假单胞菌 PelA 蛋白的功能相近:在 Pel 胞外多糖的转运过程中同时表现出水解催化活性和脱乙酰化修饰作用。此外,若将其 N 端的糖苷水解酶域进行重组表达(Snarr et al., 2017),可能还具备靶向水解 Pel 胞外多糖,破坏假单胞菌生物被膜的潜力。

在细胞外膜上,3 种假单胞菌的 PelB 蛋白均含 2 个结构域:N 端的水解酶域和 C 端的 β -桶状结构(图 3B)。PelB 蛋白的 C 端结构域中包含 1 个 TPR 结构,推测其在 Pel 系统中作为一个支架而存在,在周质空间中通过与 PelA 相互作用促进 Pel 胞外多糖的输出(Acheson et al., 2019)。3 种假单胞菌的 PelC 均不包含可识别的结构域,研究表明,在 Pel 胞外多糖转运系统中,PelC 以十二环状聚合物的形式存在,呈现一个带负电的漏斗状结构(图 3C),为 PelC 单体,将带正电荷的 Pel 多糖牵引至 PelB 的出口通道。

本研究同源建模结果表明,3 种菌 PelA-G 蛋白的折叠方式相同,三维结构能够高度重合,推测它们在 Pel 胞外多糖转运过程中发挥着相同的功能。从生物信息学的角度揭示了 3 种假单胞菌 Pel 系统结构和功能上的共性,为该转运系统的进一步研究提供重要的数据基础。

3 材料与方法

3.1 蛋白序列下载

在 NCBI 的 Protein 数据库中,选取铜绿假单胞菌 PA14、荧光假单胞菌 NBRC15842 和恶臭假单胞菌 JBC17 为研究对象,这些菌株为假单胞菌中研究较为广泛的菌株,具有完整的基因组信息,广泛应用于假单胞菌生物被膜的研究(Sana et al., 2019)。下载这 3 种菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA、PelB、PelC、PelD、PelE、PelF 以及 PelG 的氨基酸序列,其蛋白质 ID 如下:

铜绿假单胞菌 PA14: PelA (protein_id="EOT14-801.1"); PelB (protein_id="EOT14800.1"); PelC (protein_id="EOT14799.1"); PelD (protein_id="EOT1479-8.1"); PelE (protein_id="EOT14797.1"); PelF (protein_id="EOT14796.1"); PelG (protein_id="EOT14795.1")。

荧光假单胞菌 NBRC15842: PelA (protein_id: "GED73779.1"); PelB (protein_id: "GED73778.1"); PelC (protein_id: "GED73777.1"); PelD (protein_id: "GED73-776.1"); PelE (protein_id: "GED73775.1"); PelF (pro-

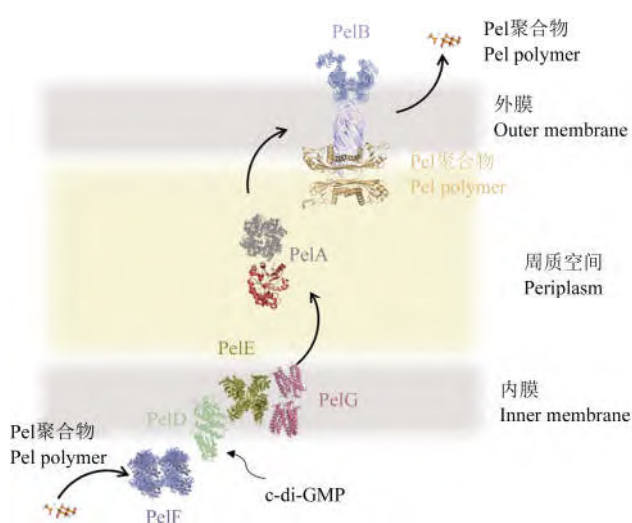


图 4 3 种常见假单胞菌 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的转运过程

Figure 4 Transport processes of proteins associated with three common *Pseudomonas* Pel extracellular polysaccharide transport systems

tein_id: "GED73774.1"); PelG (protein_id: "GED737-73.1")。

恶臭假单胞菌 JBC17: PelA (protein_id: "AWY42-675.1"); PelB (protein_id: "AWY42676.1"); PelC (protein_id: "AWY42677.1"); PelD (protein_id: "AWY426-78.1"); PelE (protein_id: "AWY42679.1"); PelF (protein_id: "AWY42680.1"); PelG (protein_id: "AWY42-681.1")。

3.2 蛋白理化性质、信号肽及跨膜区分析

运用 ExPASy 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Artimo et al., 2012) 分析铜绿假单胞菌 PA-14、荧光假单胞菌 NBRC15842 和恶臭假单胞菌 JBC-17 的 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白 PelA、PelB、PelC、PelD、PelE、PelF 和 PelG 的分子结构式、相对分子质量、理论等电点和摩尔吸光系数等一系列理化性质。

运用 SignalP 4.0 Server 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) (Owji et al., 2018) 分析铜绿假单胞菌 PA14、荧光假单胞菌 NBRC15842 和恶臭假单胞菌 JBC17 的 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的信号肽。

运用 TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Chen et al., 2014) 分析铜绿假单胞菌 PA14、荧光假单胞菌 NBRC15842 和恶臭假单胞菌 JBC17 的 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白的跨膜区位置及数量。

3.3 蛋白结构和功能分析

运用 Phyre2 在线数据库 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page>) (Kelley et al., 2015) 对铜绿假单胞菌 PA14、荧光假单胞菌 NBRC15842 和恶臭假单胞菌 JBC17 的 Pel 胞外多糖转运系统相关蛋白进行同源建模, 预测 PelA-G 蛋白的三级结构及功能域。

作者贡献

吴倩是此论文的实验研究执行人, 完成实验数据收集、分析, 以及本论文的撰写; 张昭寰与赵勇是本论文实验的构思者, 指导完成实验实施、数据分析及论文修改; 潘迎捷、黄振华和刘静参与了研究数据的采集工作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(32001800)和国家博士后创新人才支持计划(BX20190194)共同资助。

参考文献

- Acheson J.F., Derewenda Z.S., and Zimmer J., 2019, Architecture of the cellulose synthase outer membrane channel and its association with the periplasmic TPR domain, *Structure*, 27(12): 1855-1861.e3.
- Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K., Baratin D., Csardi G., de Castro E., Duvaud S., Flegel V., Fortier A., Gasteiger E., Grosdidier A., Hernandez C., Ioannidis V., Kuznetsov D., Liechti R., Moretti S., Mostaguir K., Redaschi N., Rossier G., Xenarios I., and Stockinger H., 2012, ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res.*, 40 (W1): 597-603.
- Baker P., Hill P.J., Snarr B.D., Alnabseya N., Pestrak M.J., Lee M.J., Jennings L.K., Tam J., Melnyk R.A., Parsek M.R., Sheppard D.C., Wozniak D.J., and Howell P.L., 2016, Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Sci. Adv.*, 2(5): e1501632.
- Snarr B.D., Baker P., Bamford N.C., Sato Y., Liu H., Lehoux M., Gravelat F.N., Ostapska H., Baistrocchi S.R., Cerone R.P., Filler E.E., Parsek M.R., Filler S.G., Howell P.L., and Sheppard D.C., 2017, Microbial glycoside hydrolases as antibiofilm agents with cross-kingdom activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(27): 7124-7129.
- Cao X.Y., Bao M.L., Yao Y., Xie W., Jia X.E., Jiang S.Y., Shao G., and Bade R.G., 2020, Bioinformatics analysis of DNA methylated binding protein MBD family, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 39(8): 3710-3715. (曹晓宇, 鲍牧兰, 姚远, 谢伟, 贾小娥, 姜树原, 邵国, 巴德仁贵, 2020, DNA 甲基化结合蛋白 MBD 家族的生物信息学分析, 基因组学与应用生物学, 39(08): 3710-3715.)
- Chen Q.M., Cheng D.J., Liu S.P., Ma Z.G., Tan X., and Zhao P., 2014, Genome-wide identification and expression profiling of the fatty acid desaturase gene family in the silkworm, *Bombyx mori*, *Genet. Mol. Res.*, 13(2): 3747-3760.
- Costerton J.W., Stewart P.S., and Greenberg E.P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284(5418): 1318-1322.
- Colvin K.M., Irie Y., Tart C.S., Urbano R., Whitney J.C., Ryder C., Howell P.L., Wozniak D.J., and Parsek M.R., 2012, The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix, *Environ. Microbiol.*, 14(8): 1913-1928.
- Colvin K.M., Alnabseya N., Baker P., Whitney J.C., Howell P.L., and Parsek M.R., 2013, PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.*, 195(10): 2329-2339.

- Flemming H.C., and Wingender J., 2010, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(9): 623-633.
- Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., and Howell P.L., 2011, Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, pel, and psl, *Front. Microbiol.*, 2: 167.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., and Stoodley P., 2005, Survival strategies of infectious biofilms, *Trends Microbiol.*, 13(1): 34-40.
- He X., Szweczyk P., Karyakin A., Evin M., Hong W.X., Zhang Q.H., and Chang G., 2010, Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter, *Nature*, 467(7318): 991-994.
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., and Sternberg M.J.E., 2015, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nat. Protoc.*, 10(6): 845-858.
- Kubicek J., Block H., Maertens B., Priestersbach A., and Labahn J., 2014, Expression and purification of membrane proteins, *Methods Enzymol.*, 541: 117-140.
- Jennings L.K., Storek K.M., Ledvina H.E., Coulon C., Marmont L.S., Sadovskaya I., Secor P.R., Tseng B.S., Scian M., Filoux A., Wozniak D.J., Howell P.L., and Parsek M.R., 2015, Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(36): 11353-11358.
- Liu H.Z., Li S.J., Xie X.B., and Shi Q.S., 2021, *Pseudomonas putida* actively forms biofilms to protect the population under antibiotic stress, *Environ. Pollut.*, 270: 116261.
- Marmont L.S., Rich J.D., Whitney J.C., Whitfield G.B., Almlad H., Robinson H., Parsek M.R., Harrison J.J., and Howell P.L., 2017a, Oligomeric lipoprotein PelC guides Pel polysaccharide export across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(11): 2892-2897.
- Marmont L.S., Whitfield G.B., Rich J.D., Yip P., Giesbrecht L.B., Stremick C.A., Whitney J.C., Parsek M.R., Harrison J.J., and Howell P.L., 2017b, PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biol. Chem.*, 292(47): 19411-19422.
- Owji H., Nezafat N., Negahdaripour M., Hajiebrahimi A., and Ghasemi Y., 2018, A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications, *Eur. J. Cell Biol.*, 97(6): 422-441.
- Ryder C., Byrd M., and Wozniak D.J., 2007, Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Curr. Opin. Microbiol.*, 10(6): 644-648.
- Sana T.G., Lomas R., Gimenez M.R., Laubier A., Soscia C., Chauvet C., Conesa A., Voulhoux R., Ize B., and Bleves S., 2019, Differential modulation of quorum sensing signaling through QslA in *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14, *J. Bacteriol.*, 201(21): e00362-19.
- Shahrizal M., Daimon Y., Tanaka Y., Hayashi Y., Nakayama S., Iwaki S., Narita S.I., Kamikubo H., Akiyama Y., and Tsukazaki T., 2019, Structural basis for the function of the β -barrel assembly-enhancing protease BepA, *J. Mol. Biol.*, 431(3): 625-635.
- Siriken B., Öz V., and Erol İ., 2021, Quorum sensing systems, related virulence factors, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish, *Arch. Microbiol.*, 203(4): 1519-1528.
- Tong J.R., Zhang Z.H., Huang Z.H., Liu H.Q., Pan Y.J., and Zhao Y., 2020, Bioinformatics analysis for structure and function of localization of lipoprotein system transporters in *Vibrio parahaemolyticus*, *Weishengwu Xuebao (Acta Microbiologica Sinica)*, 60(10): 2242-2252. (童金蓉, 张昭襄, 黄振华, 刘海泉, 潘迎捷, 赵勇, 2020, 副溶血性弧菌脂蛋白定位系统转运蛋白结构与功能的生物信息学分析, *微生物学报*, 60(10): 2242-2252.)
- Wang S.T., Niu Y.T., Zhang H., Li P.X., Zhang N.M., Cheng J.L., and Lin J.S. 2021, An engineered bacterium for the targeted delivery of proteins to destroy *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Weishengwu Xuebao (Acta Microbiologica Sinica)*, 61(09): 2726-2748. (王帅涛, 牛艳婷, 张恒, 李盼欣, 张宁梅, 成娟丽, 林金水, 2021, 靶向破坏铜绿假单胞菌生物被膜的定向蛋白投放技术, *微生物学报*, 61(09): 2726-2748.)
- Wang Y.G., Yang G.R., Leng F.F., Yang M.J., Wang M.G., and Chen K., 2018, Bioinformatic analysis of three membrane proteins in *Escherichia coli* MG1655, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 37(11): 4763-4768. (王永刚, 杨光瑞, 冷非凡, 杨明俊, 王鸣刚, 陈凯, 2018, 大肠杆菌 MG1655 三个膜蛋白的生物信息学分析, *基因组学与应用生物学*, 37(11): 4763-4768.)
- Whitfield G.B., Marmont L.S., Ostaszewski A., Rich J.D., Whitney J.C., Parsek M.R., Harrison J.J., and Howell P.L., 2020, Pel polysaccharide biosynthesis requires an inner membrane complex comprised of PelD, PelE, PelF, and PelG, *J. Bacteriol.*, 220(8): e00684-19.
- Whitney J.C., Colvin K.M., Marmont L.S., Robinson H., Parsek M.R., and Howell P.L., 2012, Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biol. Chem.*, 287(28): 23582-23593.
- Wiens J.R., Vasil A.I., Schurr M.J., and Vasil M.L., 2014, Iron-regulated expression of alginate production, mucoid

- phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*, mBio, 5(1): e01010-e01013.
- Xu Y., Chen W.Y., You C.P., and Liu Z.M., 2017, Development of a multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas fluorescens* with biofilm formation ability, J. Food Sci., 82(10): 2337-2342.
- Yu S.S., Wei L.Y., Xie H.A., and Zhang J.F., 2014, Progress on MATE transporters of stress resistance in rice, Fujian Nongye Xuebao (Fujian Journal of Agricultural Sciences), 29(4): 398-405. (喻丝丝, 魏林艳, 谢华安, 张建福, 2014, MATE 转运蛋白在水稻抗逆作用中的研究进展, 福建农业学报, 29(4): 398-405.)
- Zheng Y., Anderson S., Zhang Y.F., and Garavito R.M., 2011, The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications, J. Biol. Chem., 286(41): 36108-36118.

(责任编辑 蹇慧)