

水产品腐败希瓦氏菌双组分信号转导系统的全基因组鉴定与分析

李秋莹^{1,2}, 张婧阳^{1,2}, 徐瑾秀^{1,2}, 孙彤^{1,2}, 李学鹏^{1,2}, 励建荣^{1,2*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

²生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013)

摘要 腐败希瓦氏菌是水产品中的一种特定腐败菌,具有较强的低温适应性和致腐性。双组分信号转导系统(TCSs)是细菌中重要的调控系统之一,在细菌对复杂环境的感知和响应中起重要的作用。为探究 TCSs 在腐败希瓦氏菌中的分布及功能,本文采用全基因组鉴定、多序列比对、系统进化树分析、蛋白结构预测以及互作蛋白分析等多种生物信息学方法,系统分析水产品腐败希瓦氏菌中 TCSs 的分布、分类、结构与功能。结果表明:水产品腐败希瓦氏菌 WS13 菌株中存在 31 个组氨酸激酶(HKs)、36 个反应调节蛋白(RRs)、3 个成对 TCSs、3 个融合 HKs。HKs 共有 16 种结构域组成形式,其中 15 种均含有 HATPase_c 激酶催化结构域。RRs 具有 10 种结构域组成,均含有 REC 结构域。多序列比对和进化分析表明:不同结构域的 HKs 和 RRs 具有不同的进化关系,可能存在功能的多样性。3 对 TCSs 和 3 个融合 HKs 的生物学功能主要参与响应信号刺激,调控细胞内的各种代谢过程以及物质的运输等。3 个融合 HKs 均与三甲胺生成相关。研究结果为进一步探究 TCSs 在水产品腐败希瓦氏菌中的功能提供理论参考。

关键词 水产品; 腐败希瓦氏菌; 双组份信号转导系统; 生物信息学

文章编号 1009-7848(2022)06-0289-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.030

腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)是一种革兰氏阴性运动杆菌,在自然界分布广泛,是水产品的一种特定腐败菌^[1]。腐败希瓦氏菌具有较强的低温适应能力,能在冷藏水产品中生长繁殖成为优势腐败菌,同时产生腐胺、尸胺等生物胺以及三甲胺、H₂S 等异味物质,并导致水产品表面黏滑、肌肉松散、品质恶化,是引起冷藏水产品发生腐败的重要因素之一^[1]。据报道,腐败希瓦氏菌是海鲈鱼^[2]、大黄鱼^[3]、凡尔纳对虾^[4]、斑点叉尾鲷^[5]等水产品的优势腐败菌。鉴于此,腐败希瓦氏菌逐渐成为水产品保鲜领域内的研究焦点,尤其是在冷藏条件下致腐败的分子机制研究。

微生物对不同环境进行感知和响应一般是通过双组分信号转导系统(Two-component signal transduction system, TCSs)完成的^[6]。TCSs 是一种信号转导系统,目前只在细菌、古生菌和植物中发现^[7]。TCSs 可协助细菌适应复杂多变的外部环境,可以提高细菌在不同环境下的生存能力^[8]。TCSs

使细菌能够检测环境信号,并将其与应激响应所需的基因表达和生化反应过程联系起来^[9]。细菌中的 TCSs 包含一个组氨酸激酶(Histidine protein kinase, HK)和一个同源的反应调节蛋白(Response regulator protein, RR),这是简单的组氨酸-天冬氨酸组合形式。HK 在感知信号时发生自身磷酸化,并将磷酸基团转移到 RR 的保守天冬氨酸残基上,RR 接收磷酸基团后自身构象发生变化,从而执行输出功能^[10-12]。TCS 基因在细菌基因组中所占比例通常低于 5%,然而具有众多重要的功能^[8]。根据现有报道,在食源性细菌中, MalNO^[13]和 RevSR^[14]可分别影响产气荚膜梭状芽孢杆菌对麦芽糖的利用水平以及毒力调节。CesKR 和 AgrAC 可影响单增李斯特菌对抗生素的抗性^[15]。VraSR^[16]和 SrrAB^[17]可分别影响金色葡萄球菌的耐药性与致病性。

目前,关于腐败希瓦氏菌 TCSs 的研究较少。本文从 NCBI 数据库获得来自水产品的腐败希瓦氏菌 WS13 基因组信息,对其 TCSs 进行筛选和鉴定,并对 TCSs 的功能域、跨膜区、进化关系进行分析。同时,结合互作蛋白分析和 KEGG 数据库对 TCSs 功能进行预测,全面分析水产品腐败希瓦氏菌 TCSs 的特征和功能,以期抑制水产品中的腐败希瓦氏菌提供新的研究思路。

收稿日期: 2021-06-05

基金项目: 辽宁省教育厅青年科技人才“育苗”项目
(LQ2020004)

作者简介: 李秋莹(1986—),女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

1 材料与方法

1.1 基因组数据的获得

通过美国国立生物技术信息中心数据库(National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索目前已有的腐败希瓦氏菌基因组信息, 下载腐败希瓦氏菌 WS13 (NZ_CP028435.1)、腐败希瓦氏菌 CN-32 (NC_009438.1)、腐败希瓦氏菌 FDAARGOS_681 (NZ_CP046329.1)、腐败希瓦氏菌 NCTC12093 (NZ_LR134303.1)、腐败希瓦氏菌 200 (NC_017566.1)的蛋白组和基因组序列, 其中腐败希瓦氏菌 WS13 (NZ_CP028435.1)是从南美白对虾中分离得到的^[9], 被主要用于 TCSs 的挖掘和表征, 其它腐败希瓦氏菌基因组序列信息用于比较 TCSs 在不同腐败希瓦氏菌株中的分布差异。

1.2 TCSs 的全基因组鉴定

参照师舷等^[18]的方法, 根据双组份信号系统 HK 和 RR 蛋白保守结构域分析腐败希瓦氏菌 WS13 基因组中可能存在的 TCSs。本研究中的 HK 和 RR 结构域来自 Pfam 蛋白数据库 (<http://pfam.xfam.org/>), 分别为 HATPase_c (Pfam00512、Pfam01627、Pfam02518、Pfam02895、Pfam06580、Pfam07536、Pfam07568、Pfam07730)和 Response_reg (Pfam00072)。使用欧洲生物信息学研究所(European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI)研发的 HMMER 软件中的 hmmbuild 命令, 将获取的 HK 和 RR 保守域对比序列转换成隐马尔科夫模型, 随后使用 hmmsearch 命令对腐败希瓦氏菌 WS13 蛋白组进行搜索比对, 分别鉴定基因组中的 HKs 和 RR。通过 NCBI 的 BLASTp 程序对搜到的 HK 和 RR 进行确认。基因间距小于 300 bp 的 HK 和 RR 成功配对为成对 TCS。如果 HK 和 RR 结构域同时出现在一个蛋白序列位置上, 那么该蛋白定义为融合 HK; 如果 HK 和 RR 找不到相连的 RR 和 HK, 则该单个的 HK 和 RR 定义为孤儿 HK 和孤儿 RR。

1.3 结构与功能分析

利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)来分析 TCS 蛋白的功能域。TMHMM Server v.2.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)用于预测蛋白质跨膜螺旋结构域。利用 MEGA7.0 软件的 MUSCLE 进行多重序列比对, 并采用 NJ 法构建进化树。利用 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)程序进行序列相似性比对分析, 并进行功能注释, 预测分析各蛋白的功能。利用 STRING (<https://string-db.org/>)筛选 TCSs 的互作蛋白。从 KEGG 数据库中获取 TCS 的功能信息, 同时参考文献报道对各 TCS 进行功能预测。

2 结果与讨论

2.1 腐败希瓦氏菌 WS13 基因组中 TCSs 的分布

利用保守结构域对腐败希瓦氏菌 WS13 全基因组中的 TCSs 进行搜索, 结果表明, 腐败希瓦氏菌 WS13 菌株具有 31 个 HKs 和 36 个 RR, 其中 HK 与 RR 成对的 TCS 有 3 对, 融合 HK 为 3 个, 孤儿 HKs 和 RR 分别为 25 个和 33 个, 操纵子上排列方式均为 RR-HK (表 1)。不同腐败希瓦氏菌株中孤儿 HK/RR 的数量相近, 而腐败希瓦氏菌 WS13 中成对的 TCSs 数量明显少于其它 4 株腐败希瓦氏菌, 并且缺少 HK-RR 排列方式的 TCS, 这可能与腐败希瓦氏菌 WS13 的基因组全长小于其它 4 株菌有关 (表 2)。此外, 这种 TCS 多样性差异可能与菌株的遗传背景有关。腐败希瓦氏菌 CN-32、腐败希瓦氏菌 FDAARGOS_681 以及腐败希瓦氏菌 200 这 3 株菌分离自无机物 (岩石、管道) 环境, 其融合 HK 数量均为 5, 多于腐败希瓦氏菌 WS13 中融合 HK 的数量, 与脑脊髓液来源的腐败希瓦氏菌 NCTC12093 相差较大。融合 HK 较成对的 TCSs 对信号的响应更加灵活, 可更及时、准确地对细菌中各信号通路进行调控^[19]。水产品中的腐败希瓦氏菌可分解动物肌肉中的肌原蛋白; 无机环境中的腐败希瓦氏菌需要面对极端环境, 同时还能广泛利用各种物质, 其中包括具有强毒性的环境污染、氯代有机污染物、重金属和放射性元素^[20]。脑脊髓液中的腐败希瓦氏菌则要面对和适应复杂的宿主环境。环境和利用碳源的不同, 可能导致这几株菌之间遗传背景存在差异, 从而产生 TCSs 分布的差异。

表 1 腐败希瓦氏菌 WS13 基因组中 TCSs 的蛋白 ID 和类型

Table 1 Protein ID and types of TCSs in the whole genome of *S. putrefaciens* WS13

TCS 类型	蛋白质 ID
TCSs(RR-HK)	(01)WP_011789576.1/WP_011789577.1;(02)WP_025007618.1/WP_025007619.1;(03)WP_025007933.1/WP_025007934.1
融合 HK	(01)WP_011788995.1;(02)WP_025007562.1;(03)WP_128090270.1
孤儿 HK	(01)WP_011787427.1;(02)WP_011787496.1;(03)WP_011790295.1;(04)WP_011790877.1;(05)WP_011918470.1;(06)WP_011918496.1;(07)WP_011919441.1;(08)WP_011919453.1;(09)WP_014609564.1;(10)WP_025007509.1;(11)WP_025007695.1;(12)WP_025007839.1;(13)WP_025007861.1;(14)WP_025008336.1;(15)WP_025008530.1;(16)WP_025008575.1;(17)WP_061782889.1;(18)WP_061782945.1;(19)WP_061783040.1;(20)WP_061783060.1;(21)WP_061783061.1;(22)WP_061783391.1;(23)WP_128090133.1;(24)WP_128090183.1;(25)WP_128090199.1
孤儿 RR	(01)WP_006079718.1;(02)WP_007644695.1;(03)WP_011623460.1;(04)WP_011787535.1;(05)WP_011787598.1;(06)WP_011787648.1;(07)WP_011787994.1;(08)WP_011787998.1;(09)WP_011788017.1;(10)WP_011788181.1;(11)WP_011788245.1;(12)WP_011788854.1;(13)WP_011789087.1;(14)WP_011789095.1;(15)WP_011789255.1;(16)WP_011790420.1;(17)WP_011790737.1;(18)WP_011790767.1;(19)WP_011790889.1;(20)WP_011791129.1;(21)WP_011918560.1;(22)WP_014611380.1;(23)WP_025007657.1;(24)WP_025007729.1;(25)WP_025008408.1;(26)WP_025008415.1;(27)WP_025008418.1;(28)WP_025008490.1;(29)WP_025008546.1;(30)WP_061782828.1;(31)WP_128090206.1;(32)WP_128090283.1;(33)WP_128090291.1

表 2 腐败希瓦氏菌 WS13 与其它菌株基因组中 TCSs 分布情况比较

Table 2 Comparison of TCSs distribution in genomes WS13 and other strains of *S. putrefaciens*

菌株	基因组大小 /Mb	成对 TCSs			融合 HK/个	孤儿 HK/个	孤儿 RR/个
		合计/个	HK-RR/个	RR-HK/个			
WS13	4.38	3	0	3	3	25	33
CN32	4.66	9	6	3	5	27	38
FDAARGOS_681	4.66	17	9	8	5	24	30
NCTC12093	5.05	6	4	2	13	36	44
200	4.84	14	6	8	5	25	32

2.2 HKs 的结构域组成和分类

SMART 蛋白结构域分析结果显示:腐败希瓦氏菌 WS13 基因组中的 31 个 HKs 具有 16 种结构域组成形式(图 1)。11 种结构域组成形式中 HKs 的 N 端为跨膜区, HKs 的跨膜区与其感受胞外信号有关。在成对的 TCSs 中,跨膜区数量为 1~3 个,而融合 HKs 的跨膜区数量为 1~12 个,其中融合 HK01 的跨膜区为 12 个。28 个 HKs 的 C 端具有典型的 HATPase_c 激酶催化结构域;而另外 3 个孤儿 HK01、孤儿 HK03 和孤儿 HK17 通过 BLASTp 分析发现具有类似 HATPase_c 激酶催化

结构域;少部分 HKs 的 C 端具有 CheW 接受域、DNA 修复结构域、MutL_c 终端二聚体结构域;融合 HKs 还具有 REC 结构域。

典型的 HK 有 3 个组成部分在发挥重要的生物学功能,第 1 部分为 N 末端可感应外界变化;第 2 部分负责连接 N 末端和 C 末端区域;第 3 部位为具有组氨酸残基的 C 端激酶结构域。此外,还有一种杂合的 HK,即除了典型的 HK 结构域外,同时还含有一个天冬氨酸接受结构域^[21-22]。根据结构域和跨膜区可将 HKs 分为:含有 PAS 和 GAF 结构域的胞质感应 HK;含有跨膜区和 HAMP 结构

域的胞外感应 HK; 以及仅含有跨膜区和 HAT-Pase_c 的膜感应 HK^[8]。根据分析结果, 腐败希瓦氏菌 WS13 中的 HKs 绝大多数是胞外感应和膜感应类型。在结构域组成上, 同时含有 HisKA 和 HATPase_c 结构域的 HKs 有 12 个, 同时含有 HAMP、HisKA 和 HATPase_c 结构域的 HKs 有 8 个, 其余的 HKs 具有多种结构域组成, 如 PAS、PAC、HPT、H-Kinasedim 等结构域。HisKA 是磷酸受体结构域; HAMP 域是二聚体的四螺旋束, 可能调节同型二聚体受体的磷酸化或甲基化作用, 可在细菌受体中转导构象信号^[23]。PAS 结构域作为细胞内传感器, 在包括信号转导、发色团形成、运动、孢子形成和氮固定等不同方面中发挥作用^[24]。

PAC 可修饰 PAS, 可能有助于 PAS 的折叠^[15]。除了常规结构域的 HKs 外, 孤儿 HK01 具有 TOP2c 结构域, 与 DNA 拓扑异构酶 II 功能相关。孤儿 HK10 的 C 端有一个 DNA 错配修复蛋白结构域。一个 MutL_C 末端二聚结构域, 这是 DNA 修复机制中纠正复制错误的关键组件。孤儿 HK21 的 N 端为 HPT 结构域, 中部有 H-Kinase dim 结构域, C 端有一个 CheW 接受域, 其结构与张娜等^[15]发现的单增李斯特菌中 HK02 (RS05925) 结构相似。HPT 结构域可介导 HKs 和 RRs 间的信号传递。H-Kinase dim 是含有该结构域的组氨酸激酶形成二聚体的区域; CheW 参与细菌的趋化性信号传导^[15]。

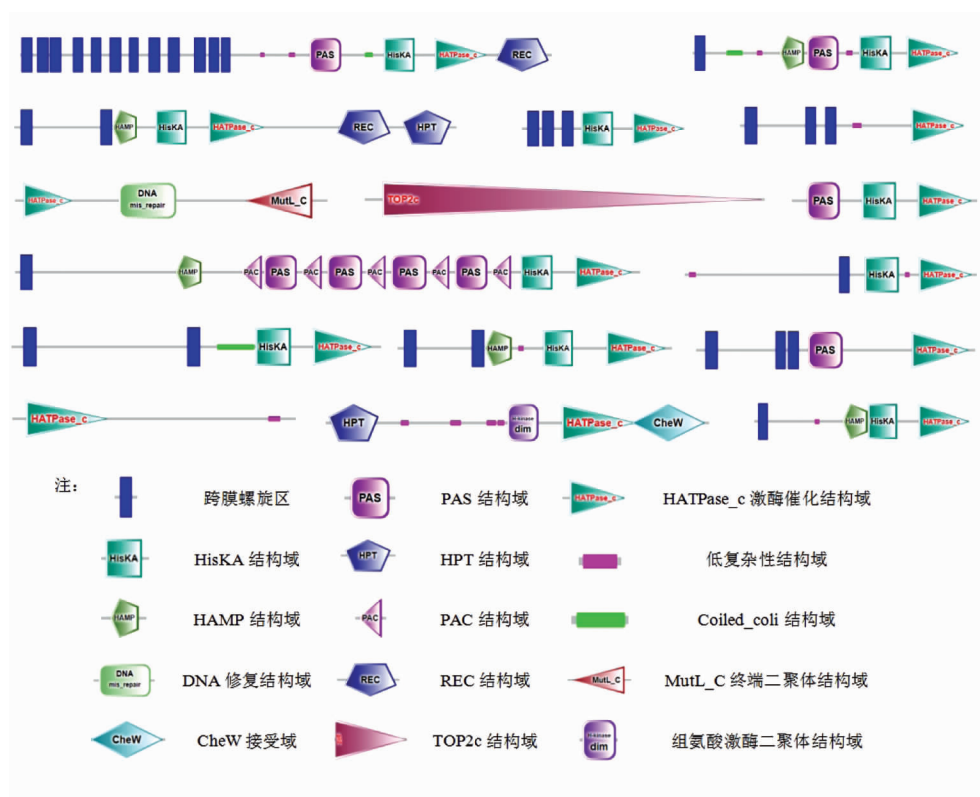


图 1 腐败希瓦氏菌 WS13 中 HKs 的结构域组成

Fig.1 Structural domain composition of HKs in *S. putrefaciens* WS13

2.3 RRs 的结构域组成和分类

与 HKs 相比, RRs 在结构域的组成上相对保守, 它由 N 端高度保守的含天冬氨酸残基的磷酸受体接受域 (REC), 以及 C 端的输出结构域两部分组成^[7]。TMHMM 的跨膜区分析结果显示 RRs 均

不具备跨膜区。腐败希瓦氏菌 WS13 基因组中共有 36 个 RRs, 然而, 只有 10 种结构域组成形式 (图 2)。每种结构域组成形式中均含有 REC 结构域, 表明磷酸受体结构域对 RRs 是必需的。15 个 RRs 属于 REC 和 Transreg_C 两种结构域组成形

式。1 个 RR_s 属于 2 个 REC 结构域组成形式。23 个 RR_s 属于由单个 REC 结构域或 REC 结构域与其它 C 端的输出结构域组成形式。C 端的输出结构域种类主要包括 CheW 结构域、AAA 结构域、HTH_LUXR 结构域、EAL 结构域、GGDEF 结构域和 HDc 结构域。不同的 C 端的输出结构域赋予 RR_s 的不同的功能。例如, CheW 结构域与细菌趋

化性信号传导有关; AAA 结构域是与多种细胞活动相关的 ATPase; HDc 结构域是具有保守结构的金属依赖性磷酸水解酶, 包含环状核苷酸磷酸水解酶; HTH_LUXR 结构域, 它可激活生物发光操纵子, 也可能与 DNA 转录作用相关; EAL 结构域, 具有二鸟苷酸磷酸二酯酶活性; GGDEF 结构域具有二鸟苷酸环化酶活性^[25]。

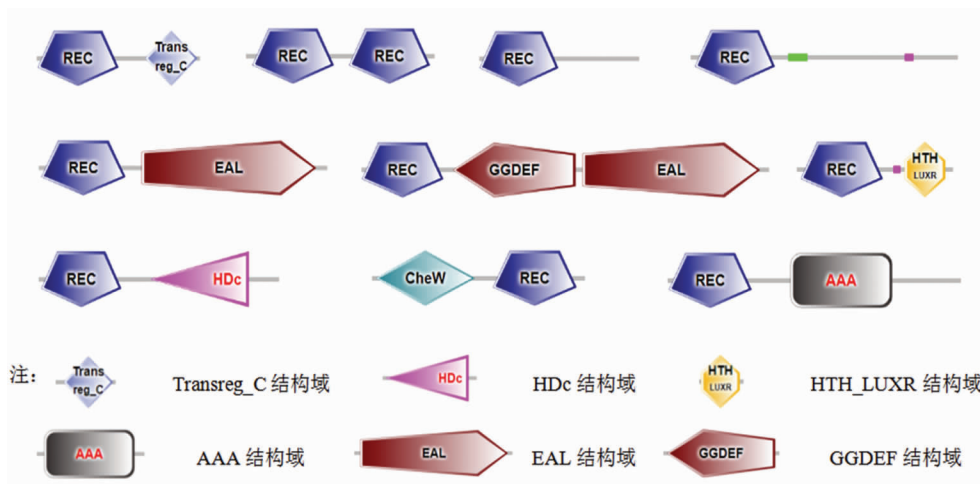


图 2 腐败希瓦氏菌 WS13 中 RR_s 的结构域组成

Fig.2 Structural domain composition of RR_s in *S. putrefaciens* WS13

2.4 HKs 和 RR_s 进化分析

为了解腐败希瓦氏菌 WS13 基因组中 TCSs 的进化关系, 分别对所有 HKs 和 RR_s 进行多序列比对和进化分析 (图 3a, 3b)。从进化关系来看, HKs 主要分为 4 个聚簇 (图 3a), 不同结构域的

HKs 具有不同的进化关系。成对 TCSs 中的 HK1 (WP_011789577.1) 和 HK3 (WP_025007934.1) 聚在一起, 具有较近的亲缘关系, 而 HK2 (WP_025007619.1) 位于另外一个聚簇。3 个融合 HK, 分别位于 3 个聚簇, 表明其亲缘关系较远, 可



图 3 腐败希瓦氏菌 WS13 中 HKs 和 RR_s 的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of HKs and RR_s in *S. putrefaciens* WS13

能具有不同功能特点。从结构域组成和序列比对分析来看,RRs的保守性比HKs要强一些,其进化树主要划分为6个聚簇(图3b)。成对TCSs中的RRs分别位于不同聚簇,其中RR1(WP_011788995.1)和RR3(WP_128090270.1)分别位于第5和第6聚簇,表明其亲缘关系更近,这与HK的分析结果类似。位于同一聚簇的HKs和RRs显示较近的亲缘关系和高度的同源性,它们更可能具有相近的功能。

2.5 成对TCSs和融合HKs的互作蛋白分析及功能预测

利用STRING对腐败希瓦氏菌WS13成对TCSs和融合HKs的互作蛋白进行分析,结果如图4所示。每种TCSs与多种蛋白存在相互作用,通过Blast P和KEGG蛋白数据库注释对其功能进行预测和分析(表3)。与TCSs01存在相互作用的蛋白主要有pdsR蛋白酶(ABP75463.1)、组氨酸激酶(ABP76854.1、ABP75462.1、ABP76854.1、ABP77677.1)、分选酶(ABP75465.1)、分选酶靶蛋白(ABP75464.1)、次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(ABP76895.1)。BLASTp结果表明:TCSs01为PdsR/PsdS系统,目前该TCS系统在细菌中的功能未知,结合KEGG数据库结果可推测TCSs01主要含有多糖结合位点,可影响细胞壁代谢(表3)。预测TCSs02的互作蛋白包括组氨酸激酶(ABP76854.1、ABP76486.1)、转运蛋白(ABP76707.1)、分选酶靶蛋白(ABP76704.1)、功能未知的DUF家族蛋白(ABP76703.1)、ABC转运蛋白(ABP76705.1)、RNA聚合酶因子(ABP74445.1)、铁氧化还原蛋白(ABP74700.1)、二硫键交换蛋白(ABP74702.1)。BLASTp注释分析TCSs02RR可能属于NtrC亚家族,推测TCSs02的

功能可能同NtrX/NtrY,该TCS在苜蓿中华根瘤菌和变形红细菌中可影响胞外被膜的生成并影响细胞形态^[20]。此外,可能影响细胞壁代谢和乙酰乙酸代谢。TCSs03可能的互作蛋白包括转录调节因子(ABP73784.1、ABP76790.1)、钾转运ATP酶(kdpB、kdpC、kdpA)、整合膜传感器组氨酸激酶(ABP73785.1)、K⁺通道信号转导组氨酸激酶(ABP76791.1)、整合膜传感器组氨酸激酶(ABP75803.1)、组氨酸激酶(ABP76854.1、ABP75703.1)。注释分析表明TCSs03的功能同kdpDE,包括感应K⁺信号刺激、调节渗透压等。与融合HK01存在相互作用的蛋白包括组氨酸激酶(ABP76854.1)、LuxR家族的转录调节子(ABP75968.1)、L-脯氨酸脱氢酶(ABP76812.1)、乙酰辅酶A合成酶(acsA)、CheA信号转导组氨酸激酶(ABP76277.1)。注释分析表明融合HK01可能参与Na⁺/脯氨酸转运,并与三甲胺形成相关。与融合HK02存在互作的蛋白包括组氨酸激酶(ABP76040.1)、应答调节剂受体调节的CheW蛋白(ABP76214.1、ABP76517.1、ABP76320.1)、转录调节子(ABP75664.1)。融合HK02含有WalK(NF033092)超家族的保守结构,是一种细胞壁代谢传感器组氨酸激酶,结合BLASTp结果,推测融合HK02可能参与渗透压调节,并与细胞壁代谢、三甲胺形成相关。融合HK03的互作蛋白可能包括组氨酸激酶(ABP76854.1、ABP76040.1)、LuxR家族的转录调节子(ABP75364.1)、双鸟苷酸环化酶(ABP76798.1)、应答调节剂受体调节的CheW蛋白(ABP76214.1)。注释分析表明融合HK03可能参与碳代谢的调节,并与三甲胺形成相关。3个融合HK均有TorS结构域,在希瓦氏菌中,Tor在缺氧环境下参与氧化三甲胺呼吸,表明可能与三

表3 腐败希瓦氏菌WS13 TCSs功能预测

Table 3 Functional prediction of TCSs in *S. putrefaciens* WS13

编号	预测功能
TCSs01	PdsR/PsdS;可能是多糖结合位点,影响细胞壁代谢
TCSs02	可能同NtrX/NtrY;影响细胞壁代谢,调节乙酰乙酸代谢
TCSs03	可能同KdpE/KdpD;K ⁺ 信号刺激、调节渗透压
融合HK01	Na ⁺ /脯氨酸转运,三甲胺形成相关
融合HK02	调节渗透压,与细胞壁代谢、三甲胺形成相关
融合HK03	三甲胺形成相关,可能参与碳代谢的调节

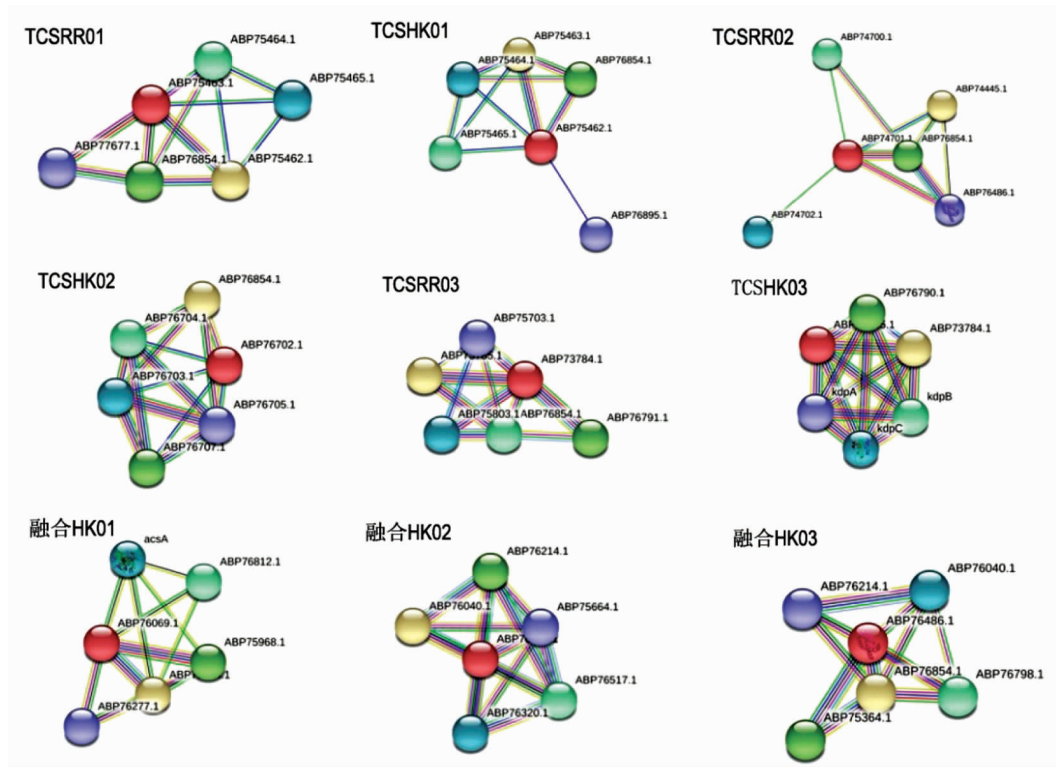


图 4 腐败希瓦氏菌 WS13 TCSs 的互作蛋白

Fig.4 Interaction proteins of TCSs in *S. putrefaciens* WS13

甲胺生成相关^[27]。碳源的利用影响细菌的生长繁殖,融合 HK 与氧化三甲胺的还原有关,这可能有助于腐败希瓦氏菌的营养物质摄入。

2.6 孤儿 HKs 和 RRs 的功能预测

通过 Blast P 和 KEGG 蛋白数据库注释对孤儿 HKs 和 RRs 的功能进行预测和分析。25 个孤儿 HK 预测的功能主要包括:参与 DNA 解旋、错配修复;响应渗透压、氮信号、金属离子和重金属信号刺激;调节三甲胺形成、C4-二羧酸盐转运、有氧呼吸过程、分子伴侣表达、磷酸盐代谢以及柠檬酸/苹果酸代谢。2 个孤儿 HK 与 3 个融合 HKs 一样具有 TorS 结构域,可能与三甲胺生成相关^[27]。

33 个孤儿 RR 主要属于 OmpR、CheB、CheC、CheW、CheY、NarL、NtrC 等亚家族,预测其主要功能包括:控制细菌运动能力、磷酸化介导起始、调节 DNA 结合、转录和乙酰乙酸代谢等。OmpR 是孤儿 RR 中最多的亚家族,也是最大的 RR 蛋白家族,在伤寒杆菌中可参与酸化,调节细胞内 pH 值,而未见其在希瓦氏菌属中的报道^[28]。其它部分孤儿 RR 分属于 CitB、PhoB、PhoP、FixJ、KdpE、

RpfG、RssB、RstA、RcpA 等亚家族,预测功能包括:参与氧化还原反应、细菌色素调节;调节细胞表面的黏附性、磷酸盐转运以及柠檬酸/苹果酸代谢;影响细菌毒力和致病性等。

3 结论

采用生物信息学方法对腐败希瓦氏菌 WS13 的 TCSs 进行全基因组鉴定、结构域组成分析和功能预测。腐败希瓦氏菌 WS13 菌株含有 3 对 TCSs,3 个融合 HK,25 个孤儿 HKs 和 33 个孤儿 RRs。这些 HKs 和 RRs 的结构域组成类型丰富。其中,HKs 具有 16 种结构域组成,大多数 HKs 的 N 末端具有接受信号的信号输入结构域,如跨膜区、HisKA、HAMP、PAS、PAC 等结构域。RRs 有 10 种结构域组成,并主要属于 OmpR、CheB、CheC、CheW、CheY、NarL、NtrC 等亚家族。腐败希瓦氏菌 WS13 中的成对的 TCSs 与融合 HKs 的数量较少,同时与多种蛋白存在相互作用。研究结果呈现了腐败希瓦氏菌 WS13 全基因组中 TCSs 的整体情况,为后续开展 TCSs 在腐败希瓦氏菌中的功能研

究及水产品腐败希瓦氏菌新型抑制剂的筛选提供一定的参考。

参 考 文 献

- [1] 杨胜平, 章缜, 程颖, 等. 培养温度对腐败希瓦氏菌 DSM6067 生长动力学及细胞膜理化特性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 228-236.
YANG S P, ZHANG Z, CHENG Y, et al. Effects of culture temperature on the growth parameters of *Shewanella putrefaciens* DSM6067 and its membrane physico-chemical properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 228-236.
- [2] 朱金帅, 李秋莹, 于昕睿, 等. 酚酸对水产品腐败希瓦氏菌的抑菌作用[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 133-137.
ZHU J S, LI Q Y, YU X R, et al. Antibacterial effect of phenolic acid on *Shewanella putrefaciens* from aquatic product[J]. Food and Machinery, 2020, 36(6): 133-137.
- [3] 朱军莉, 赵二科, 孙丽霞, 等. 冷藏大黄鱼腐败菌群和群体感应信号分子的动态变化规律[J]. 中国食品学报, 2015, 15(4): 175-182.
ZHU J L, ZHAO E K, SUN L X, et al. Dynamic variation rule of spoilage bacterial and quorum sensing signal molecules in the refrigerated large yellow croaker[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(4): 175-182.
- [4] CHEN L, YANG S, QIAN Y, et al. Sequencing and Analysis of the *Shewanella putrefaciens* WS13 Genome[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2019, 13(2): 182-187.
- [5] YANG Z Q, TAO X Y, ZHANG H, et al. Isolation and characterization of virulent phages infecting *Shewanella baltica* and *Shewanella putrefaciens*, and their application for biopreservation of chilled channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 292: 107-117.
- [6] SANDEEP T, JAMAL S B, HASSAN S S, et al. Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: An overview[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1878.
- [7] JACOB-DUBUISSON F, MECHALY A, BETTON J M, et al. Structural insights into the signaling mechanisms of two-component systems [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(10): 585-593.
- [8] 李秋莹, 张东栋, 王司雯, 等. 食源性细菌低温适应的分子机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 246-252.
LI Q Y, ZHANG D D, WANG S W, et al. Advances in molecular mechanisms of cold-adapting foodborne bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 246-252.
- [9] WUICHET K, CANTWELL B J, ZHULIN I B. Evolution and phylogenetic distribution of two-component signal transduction systems [J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(2): 219-225.
- [10] LEMMER K C, ALBERGE F, MYERS K S, et al. The NtrYXtwo-Component system regulates the bacterial cell envelope[J]. Molecular Biology and Physiology, 2020, 11(3): e00957-20.
- [11] DHAR Y V, LAKHWANI D, PANDEY A, et al. Genome-wide identification and interactome analysis of members of two-component system in banana[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 674.
- [12] MANASI P B, MOLNAR K S, GOULIAN M, et al. Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures[J]. Structure, 2015, 23(6): 981-994.
- [13] HISCOX T J, OHTANI K, SHIMIZUT, et al. Identification of a two-component signal transduction system that regulates maltose genes in *Clostridium perfringens* [J]. Anaerobe, 2014, 30: 199-204.
- [14] CHEUNG J K, WISNIEWSKI J A, ADAMS V M, et al. Analysis of the virulence-associated RevSR two-component signal transduction system of *Clostridium perfringens* [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2016, 306(6): 429-442.
- [15] 张娜, 欧娅, 郑金水, 等. 单增李斯特菌食品分离株 LM201 的双组分信号转导系统的生物信息学分析[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(1): 96-104.
ZHANG N, OU Y, ZHENG J S, et al. Bioinformatics analysis of double-component signal transduction systems of *Listeria monocytogenes* LM201 isolated strain from food stuff[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(1): 96-104.
- [16] AGUSTINA T, VARELA M C, ROSATO R R, et al. VraSR and virulence trait modulation during daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphy-*

- lococcus aureus* infection [J]. mSphere, 2019, 4(1): e00557-18.
- [17] TIWARI N, LÓPEZ-REDONDO M, MIGUEL-ROMERO L, et al. The SrrAB two-component system regulates *Staphylococcus aureus* pathogenicity through redox sensitive cysteines [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(20): 10989-10999.
- [18] 师舷, 刘佳璐, 董极靓, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Q426 双组分信号转导系统的生物信息学分析 [J]. 生物技术, 2019, 29(4): 348-354.
- SHI X, LIU J L, DONG J L, et al. Bioinformatic analysis of two-component signal transduction systems in *Bacillus amyloliquefaciens* Q426 [J]. Biotechnology, 2019, 29(4): 348-354.
- [19] 杨若兰. 欧美杨细菌性溃疡病菌双组分系统的鉴定、突变及 KdpD-KdpE 致病性功能解析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
- YANG R L. Identification and mutation of two-component systems and functional analysis of KdpD-KdpE of *Lonsdaleaquercina* subsp. *popul* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018.
- [20] 潘婷婷. 腐败希瓦氏菌介导合成纳米材料及其催化还原硝基苯的性能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- PAN T T. Formation of nanomaterials mediated by *Shewanella putrefaciens* and catalytic properties towards nitrobenzene [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [21] ZSCHIEDRICH C P, KEIDEL V, SZURMANT H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction [J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(19): 3752-3775.
- [22] 陈利达, 黄彬. 铜绿假单胞菌的双组分系统 [J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(10): 941-945.
- CHEN L D, HUANG S. The two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(10): 941-945.
- [23] SUKOMON N, WIDOM J, BORBAT P P, et al. Stability and conformation of a chemoreceptor HAMP domain chimera correlates with signaling properties [J]. Biophysical Journal, 2017, 112(7): 1383-1395.
- [24] SARKAR I, NORMAND P, TISA L S, et al. Characterization of PAS domains in Frankia and selected Actinobacteria and their possible interaction with other co-domains for environmental adaptation [J]. Symbiosis, 2016, 70(1): 69-78.
- [25] SCHAECHTER M. Encyclopedia of Microbiology (3rd Edn) [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2009: 447-463.
- [26] NIEVES C M, JOAQUINA N, KINIA A, et al. The NtrY/NtrX System of *Sinorhizobium meliloti* GR4 regulates motility, EPS I production, and nitrogen metabolism but is dispensable for symbiotic nitrogen fixation [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 30(7): 566-577.
- [27] LEMAIRE O N, HONORÉ F A, JOURLIN-CASTELLI C, et al. Efficient respiration on TMAO requires TorD and TorE auxiliary proteins in *Shewanella oneidensis* [J]. Research in Microbiology, 2016, 167(8): 630-637.
- [28] CHAKRABORTY S, WINARDHI R S, MORGAN L K, et al. Non-canonical activation of OmpR drives acid and osmotic stress responses in single bacterial cells [J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 1587.

Genome-wide Identification and Analysis of Two-component Signal Transduction Systems in *Shewanella putrefaciens* from Aquatic Products

Li Qiuying^{1,2}, Zhang Jingyang^{1,2}, Xu Jinxiu^{1,2}, Sun Tong^{1,2}, Li Xuepeng^{1,2}, Li Jianrong^{1,2*}

¹College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract *Shewanella putrefaciens* is a kind of specific spoilage organism of aquatic products, which possess strong cold adaptability and spoilage ability. Two-component signal transduction systems (TCSs) is one of the most important regulatory systems in bacteria, and plays an important role in the perception and response of bacteria to complex environment. In order to explore distribution and function of TCSs in *S. putrefaciens*. In this paper, the distribution, classification,

structure and function of TCSs in *S. putrefaciens* from aquatic products, were systematically analyzed by bioinformatics methods, including whole genome identification, multiple sequence alignment, phylogenetic analysis, protein structural prediction and interaction protein analysis. The results showed that there were 31 histidine kinases (HKs), 36 response regulators (RRs), 3 pairs of TCSs and 3 fusion HKs in *S. putrefaciens* WS13. There are 16 types of structural domain compositions in HKs, 15 of which possess HATPase_c kinase catalytic domains. RR has 10 types of structural domain compositions, all of which contain REC domains. Multiple sequence alignment and evolutionary analysis showed that HKs and RRs with different structural domains had different evolutionary relationships, which suggested functional diversity of these proteins. The biological functions of 3 pairs of TCSs and 3 fusion HKs were predicted to be mainly involved in response to signal stimulation, regulation of various metabolic processes and transport of substances in cells. Moreover, 3 fusion HKs were related to the formation of trimethylamine. The results provide references for further exploring the function of TCSs in *S. putrefaciens* from aquatic products.

Keywords aquatic products; *Shewanella putrefaciens*; two-component signal transduction system; bioinformatics