

鱼源荧光假单胞菌分泌蛋白的全基因组预测与功能分析

李秋莹^{1,2}, 张雪婷^{1,2}, 崔方超^{1,2}, 檀茜倩^{1,2}, 孙 彤^{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 目的: 荧光假单胞菌是冷藏海水鱼的优势腐败菌, 具有较强的胞外蛋白分泌能力是其导致鱼类腐败的重要因素之一。本文探究其全基因组水平胞外蛋白的组成、特征及分泌途径。方法: 采用多种生物信息学分析软件对鱼源荧光假单胞菌 PF08 胞外蛋白分泌情况进行预测和功能分析。结果: 荧光假单胞菌 PF08 全基因组编码的 5 514 条蛋白中, 筛选到 66 个具有 Sec/SPI 型信号肽, 定位在胞外, 不具有或只有一个跨膜结构以及无 GPI 锚定位点的经典分泌蛋白。蛋白长度大多为 101~400 个氨基酸, 多为小分子蛋白, 且疏水性氨基酸组成所占比例最高。通过 Nr 数据库注释到 13 个菌毛蛋白、11 个酶类、2 个鞭毛蛋白、7 个 DUFs 家族蛋白、17 个未知功能假定蛋白及 16 个其它功能蛋白。通过 COG 分析, 这些蛋白主要注释到细胞内运输、分泌和囊泡运输, 细胞运动, 信号转导及细胞壁、膜、生物包膜等功能类别。GO 注释显示这些蛋白在生物过程、细胞成分和分子功能 3 个类别中均注释丰富。结论: 荧光假单胞菌的经典分泌蛋白组由不同功能性质的蛋白质组成, 涉及促进荧光假单胞菌的胞外定殖、生物被膜形成、分解食品组分等方面的关键蛋白, 为进一步研究荧光假单胞菌对鱼类的致腐机制提供重要依据。

关键词 荧光假单胞菌; 分泌蛋白; 生物信息学; 腐败

文章编号 1009-7848(2024)09-0434-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.040

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 是一种广泛存在于肉制品、奶制品、水产品的革兰氏阴性腐败菌^[1-2]。由于其具有很强的低温适应性, 可导致 4℃冷藏海产品造成严重的腐败变质, 因此是许多冷藏海水鱼类的优势腐败菌^[3-4]。此外, 荧光假单胞菌极易在水产品或生产设备表面形成生物被膜, 使其对环境胁迫的耐受性增强, 其在水产品贮藏与加工过程中的不可控性, 严重威胁着海洋鱼类的质量与安全^[3,5]。荧光假单胞菌的胞外物质特别是胞外蛋白的积累, 是导致鱼类腐败的重要原因之一。荧光假单胞菌具备较强的胞外酶分泌能力, 例如蛋白酶、脂肪酶和氧化酶等, 这些胞外酶分解鱼肉营养成分, 造成肌肉蛋白和脂肪的降解和氧化, 加速鱼类腐败变质^[5-6]。此外, 细菌的部分胞外蛋白作为基质蛋白, 在生物被膜形成时发挥重要作用^[7-8]。一些酶类还可以在生物被膜形成晚期降解蛋白, 为被膜菌提供营养^[9-10]。明确荧光

假单胞菌胞外蛋白的组成、功能及分泌调控, 对于解析荧光假单胞菌的致腐机制至关重要。

根据细菌分泌的胞外蛋白是否具有信号肽, 可划分为经典分泌蛋白和非经典分泌蛋白。经典分泌蛋白是依赖于信号肽分泌途径 (经典分泌途径) 分泌的, 主要包括一般分泌途径 (Sec) 和双精氨酸易位 (Tat) 途径, 其中 Sec 分泌途径对于细菌存活至关重要^[11-12]。大肠杆菌中 96% 的输出蛋白是通过 Sec 途径分泌的, 60% 是质膜蛋白^[12]。非经典分泌蛋白是不依赖于信号肽的分泌蛋白 (非经典分泌途径), 此类蛋白质细胞定位分析多是定位于细胞质的, 关于它们的分泌途径和机理尚不明晰。

随着组学技术的发展, 可以通过蛋白质组学技术鉴定细菌胞外分泌蛋白。Wang 等^[13]对原料乳中 1 株荧光假单胞菌 W3 的胞外蛋白进行蛋白质组学分析, 鉴定了一些对乳制品造成潜在危害蛋白酶。然而, 对鉴定的胞外蛋白还需了解其所属分泌途径, 为后续研究分泌调控机制奠定基础, 进而解析腐败菌致腐机制。基于经典分泌途径依赖信号肽的特点, 可以通过生物信息学技术预测细菌胞外蛋白组成及其分泌途径, 然而从全基因组水平分析鱼源荧光假单胞菌胞外分泌蛋白未见报道。

收稿日期: 2023-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32202141); 辽宁省教育厅面上项目 (JYTMS20231617)

第一作者: 李秋莹, 女, 博士, 副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lij6491@163.com

经典分泌蛋白通常具有 N-端信号肽,亚细胞定位在细胞外,没有跨膜结构域,不含有糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定位点^[14-16]。根据经典分泌蛋白的上述特征,本研究利用多种生物信息学分析软件对鱼源荧光假单胞菌的经典分泌蛋白进行全基因组预测和功能分析,以期探究荧光假单胞菌经典分泌蛋白组成、功能及分泌途径,为后续解析鱼源荧光假单胞菌的致病机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 荧光假单胞菌全基因组蛋白序列下载

荧光假单胞菌 PF08 菌株分离自腐败的大菱鲆,其全基因组蛋白质序列可以从美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索下载。该基因组 (GenBank No. CP032618.1)包含 5 514 条蛋白质序列,下载并保存为 FASTA 格式。

1.2 分泌蛋白筛选程序

利用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件对荧光假单胞菌 PF08 基因组所编码的 5 514 个蛋白质是否具有 N-端信号肽进行预测^[17]。经 SignalP 预测含有信号肽的蛋白进一步通过蛋白亚细胞定位在线预测软件 CELLO v2.5: subCELLular LOcalization predictor (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)进行亚细胞定位分析^[18]。预测定位在细胞外的蛋白序列进一步通过在线软件 Deep TMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)进行跨膜结构预测^[19]。利用在线软件 NetGPI v1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetGPI>)预测蛋白质是否锚定到细胞膜上^[20]。

1.3 荧光假单胞菌分泌蛋白特征分析

采用在线工具 Expasy ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)通过输入每个蛋白的序列,对预测所得的荧光假单胞菌 PF08 经典分泌蛋白的氨基酸序列长度和组成进行计算,再利用 Excel 2016 对所得结果进行数据统计和整理。

1.4 荧光假单胞菌分泌蛋白的功能注释

1.4.1 分泌蛋白的 Nr 注释 分泌蛋白序列通过 NCBI BLASTP 程序与 Nr 数据库中已知蛋白进行比对分析,预测分泌蛋白的功能。将所有比对结果

按照序列名升序,相似度和评分倒序筛选出每组比对结果中得分最高的同源序列功能作为对应分泌蛋白的参考功能,并对功能进行分类。

1.4.2 分泌蛋白的 COG 注释 通过在线软件 eggNOG-mapper (<http://eggno-mapper.embl.de/>)和 eggno-mapper 数据库进行分泌蛋白序列的 COG 功能注释和聚类分析^[21]。

1.4.3 分泌蛋白的 GO 注释 通过在线预测软件 NetGOv3.0 (<https://dmiiip.sjtu.edu.cn/ng3.0/>),基于蛋白质的自动功能预测(AFP)的方法对荧光假单胞菌分泌蛋白组进行 GO 功能注释^[22]。根据置信度的评分大于 0.6 的 GO 术语,使用 Excel 2016 再对 GO 注释通路进行筛选、统计与分类分析。

2 结果与讨论

2.1 荧光假单胞菌全基因组蛋白 N-端信号肽预测

荧光假单胞菌 PF08 分泌蛋白筛选程序和结果如图 1 所示。首先进行 N-端信号肽预测。SignalP5.0 适用于各类生物体蛋白的信号肽预测并区分信号肽的类型,可以根据氨基酸序列预测信号肽区域^[17]。荧光假单胞菌 PF08 全基因组共编码 5 514 条蛋白序列,经过 SignalP5.0 软件分析,共检测到 896 条蛋白序列含有 N-端信号肽序列,这些占总蛋白序列条数的 16.25%。覃悦等^[23]对黄单胞菌 (*Xanthomonas cam pestri* B100、CN14、8004)进行信号肽预测,分别检测到含有信号肽的蛋白质占总蛋白序列的 17.10%,17.26%,15.03%,这与本研究含有信号肽的蛋白占总蛋白序列的比例相近。黄单胞菌所属的黄单胞菌属与假单胞菌属同属于假单胞菌科(Pseudomonadaceae)^[24]。细菌分泌蛋白在胞内合成后是经过不同分泌途径分泌出胞外的^[25]。例如,通过 Sec 途径通过质膜运输的,这类蛋白含 Sec/SP I 或 Sec/SP II 型信号肽;通过 Tat 途径运输,这类蛋白含 Tat/SP I 型信号肽^[26]。本研究中含信号肽蛋白属于 Sec 分泌蛋白的有 856 条,在所有含信号肽序列蛋白中占比达 95.54%,属于 Tat 分泌蛋白的只有 40 条,这符合细菌中大多数的分泌蛋白质是通过 Sec 途径运输的蛋白分泌特点^[12]。在 896 条含信号肽的蛋白序列中非脂

蛋白信号肽有 667 条,占比 74.44%,脂蛋白信号肽有 229 条,占比 25.56%。这些脂蛋白信号肽均

属于 Sec/SPII 型的,大多数定位在外膜的脂蛋白最初是通过 Sec 系统跨内膜转运,再分泌到外膜^[27]。

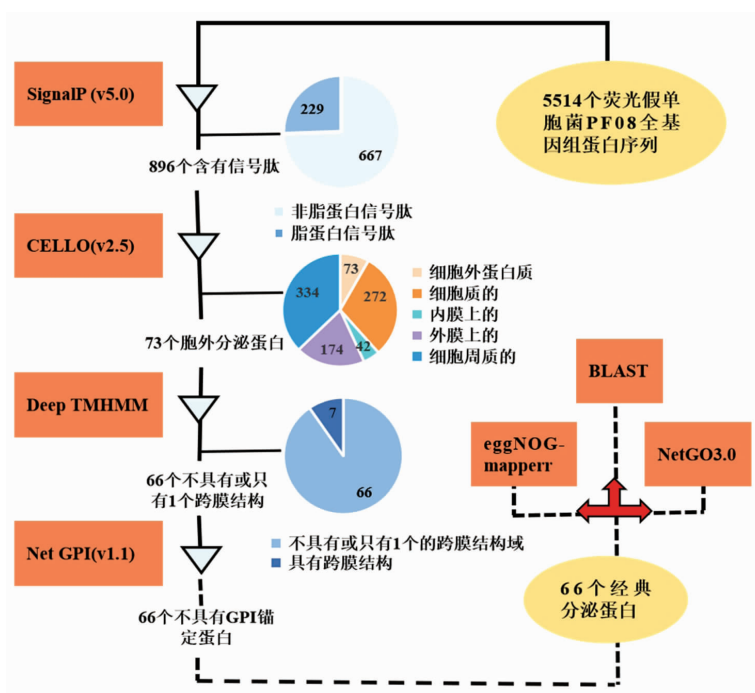


图 1 荧光假单胞菌 PF08 分泌蛋白筛选程序

Fig.1 Secretory proteins screening program for *Pseudomonas fluorescens* PF08

2.2 荧光假单胞菌全基因组蛋白的亚细胞定位分析

革兰氏阴性菌具有细胞质、内膜、周质空间、外膜和细胞外空间 5 个主要的亚细胞定位位点, CELLO 是用于预测革兰氏阴性细菌亚细胞定位的有效手段^[18]。采用 CELLO 对荧光假单胞菌 PF08 中含有信号肽的蛋白序列进行亚细胞定位分析。在 896 条蛋白中有 73 条蛋白序列定位在细胞外空间,仅占总蛋白序列条数的 1.32%,而其余的蛋白序列虽然具有信号肽,但其并不分泌到细胞外,而是转运到细胞中的其他位置。其中定位到细胞质的有 272 条,占总蛋白序列条数的 4.93%;定位到内膜上的有 42 条, 占总蛋白序列条数的 0.76%;定位到外膜上的有 174 条,占总蛋白序列条数的 3.16%;定位到细胞周质的有 334 条,占总蛋白序列条数的 6.06%。共 73 个预测定位在细胞外空间的蛋白应进行进一步分析。

2.3 荧光假单胞菌分泌型蛋白的跨膜结构预测

跨膜蛋白跨越脂质双层,分为 α 螺旋和 β 折

叠这两个主要的结构类别,跨膜蛋白的跨膜结构域一般是疏水的,而膜外结构一般是亲水的,通常其 α -螺旋结构中长度约为 20~25 个氨基酸残基的区域是其跨越细胞膜的区域^[28]。Deep TMHMM 是一种基于深度学习蛋白质语言模型的算法,高精度检验和预测 α 螺旋和 β 折叠的拓扑^[19]。对上述 73 个具有信号肽序列且预测定位在胞外的蛋白进行跨膜结构域预测发现共有 7 条蛋白序列具有跨膜区,在 73 个具有信号肽的胞外分泌蛋白中所占比例为 9.59%。没有或只有一个跨膜结构的蛋白质有 66 条。

2.4 荧光假单胞菌分泌型蛋白的 GPI 锚定位点预测

目前,糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白是一类主要通过羧基末端的 GPI 结构锚定于细胞膜表面而不跨越磷脂双分子层结构的蛋白质,可以通过 GPI 锚定位点预测该蛋白质是否锚定到细胞膜上^[29-30]。对上述 66 条未预测到跨膜结构定位于胞外的蛋白经 Net GPI 软件进行 GPI 锚定位点分

析。结果表明这 66 条蛋白序列均不含 GPI 锚定位点,均符合经典的分泌蛋白特征,故预测这 66 条蛋白序列为荧光假单胞菌 PF08 的胞外分泌蛋白组组分,共占基因组总编码序列的 1.20%。

2.5 荧光假单胞菌分泌蛋白的氨基酸序列长度和组成分析

对预测所得的荧光假单胞菌 PF08 分泌蛋白组的 66 个经典分泌蛋白的氨基酸序列长度和组成进行数据统计和整理。这些分泌蛋白质中序列长度最长的有 1 618 个氨基酸,最短的有 78 个氨基酸。虽然氨基酸序列长度分布跨度较大,但具有经典分泌蛋白特征的基因编码蛋白的氨基酸长度大多为 101~400 个氨基酸之间,共有 52 条蛋白序

列(图 2a),占比达 78.79%,绝大部分是小分子蛋白,所含氨基酸长度较小。分泌蛋白的氨基酸组成如图 2b 所示,20 种氨基酸在荧光假单胞菌 PF08 分泌蛋白中的含量差异明显。含量由高到低依次为 G、A、S、T、L、V、N、R、P、D、Q、I、K、E、F、Y、H、M、C、W。综合来看,非极性的疏水性氨基酸(A、G、L、V、P 和 I) 含量最多,占分泌蛋白中所有氨基酸的 43.81%, 其次是亲水性氨基酸 (S、T、N、Q、M 和 C),占分泌蛋白中所有氨基酸的 29.81%,其它碱性氨基酸(K、R 和 H)的含量为 10.94%,酸性氨基酸(D 和 E)的含量为 8.64%,芳香族氨基酸(F、Y 和 W)的含量为 6.79%。

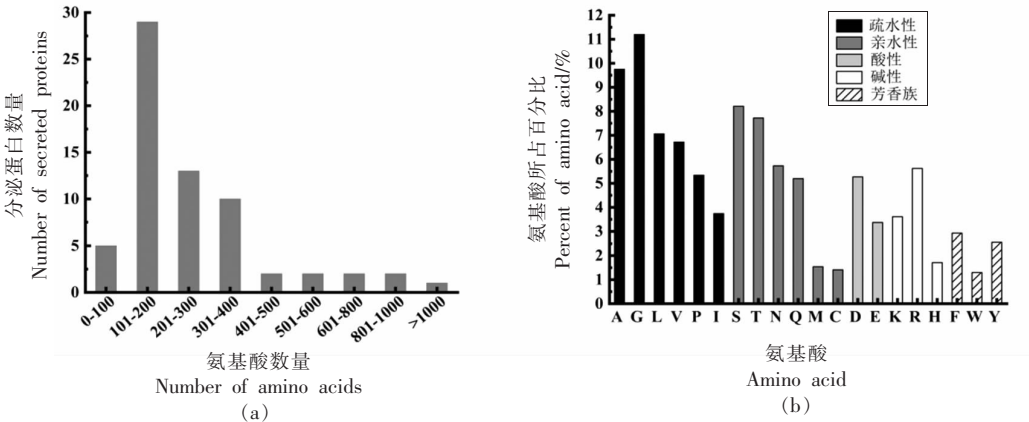


图 2 分泌蛋白氨基酸长度分布与组成占比

Fig.2 Amino acid length distribution and composition proportion of secreted proteins

2.6 荧光假单胞菌分泌蛋白功能注释分析

2.6.1 荧光假单胞菌分泌蛋白的 Nr 注释 荧光假单胞菌 PF08 经典分泌蛋白经 Nr 数据库比对结果显示共 49 个分泌蛋白检索到具体功能及注释信息的同源蛋白,其中注释到 13 个菌毛相关蛋白,11 个酶类,2 个鞭毛相关蛋白。还注释到许多其它功能蛋白,如黏附素、磷酸 ABC 转运蛋白底物结合蛋白、自转运体外膜蛋白、五肽重复结构域蛋白质、含甘氨酸拉链 2TM 结构域蛋白、链烷烃氧化蛋白激活剂 PraB、抗病毒调节剂 CigR 家族蛋白、DUFs 家族蛋白等。DUFs 是指未知功能结构域蛋白家族,该家族蛋白至少包含 1 个高度保守的 DUF 结构域,是一大群并未表征功能的蛋白^[31-32]。本研究共 7 个 DUFs 结构域蛋白是未知功能的,分别包含了 DUF1120、DUF2780、DUF3015、

DUF4822、DUF4879 等几个高度保守的结构域。此外,注释到 17 个无明确功能信息的假定蛋白,占全部预测所得经典分泌蛋白的 25.76%。假定蛋白是细菌蛋白的重要组成部分,Ling 等^[33]研究发现,假定蛋白在嗜碱芽孢杆菌 G1 分泌组中对于高碱性环境的耐受胁迫具有重要作用,pH 值为 11 时,假定蛋白占鉴定的总差异表达量的 18%。荧光假单胞菌中无功能注释的假定蛋白也可能具有重要生物功能,有待于进一步挖掘。

注释到的菌毛相关蛋白和鞭毛相关蛋白如表 1 所示。注释到的菌毛蛋白多是 I 型菌毛蛋白及其亚基和 CS1 型菌毛主要亚基等,大多属于 FimA 超家族。菌毛在细菌的表面黏附、细胞与细胞之间的聚集以及生物膜形成中起作用^[34]。注释到鞭毛蛋白共 2 个,分别是鞭毛基部 L-环蛋白 FlgH、鞭

毛钩相关蛋白 FlgK。FlgH 和 FlgK 是细菌鞭毛的重要组成蛋白,鞭毛参与细菌的运动,与趋化性相关。Terahara 等^[35]的研究表明,在应激条件下 FlgK 的上调有助于维持鞭毛的生理完整性,使得细菌的运动性升高。此外,还注释到了 2 个黏附素蛋白,是细菌表面蛋白,与细菌的黏附作用有关。

注释到的胞外分泌酶类如表 2 所示。这些胞

外酶根据其催化反应类型主要分为水解酶、合成酶、氧化还原酶及转移酶等。其中,注释到的水解酶类最多,涉及磷酸酶、肽酶、内切酶、蛋白酶等水解酶。肽酶、蛋白酶等降解鱼肉蛋白,形成游离氨基酸、可溶性肽,而磷酸酶影响肌肉蛋白的磷酸化造成鱼肉质构劣化^[36]。这些胞外酶在荧光假单胞菌对鱼类致腐过程中发挥潜在作用。合成酶涉及

表 1 荧光假单胞菌 PF08 分泌的菌毛和鞭毛有关蛋白及其保守结构域

Table 1 Secretory fimbrial and flagellin associated proteins and their conserved domains of *P. fluorescens* PF08

编号	Nr 功能注释	保守结构域(比例:100 个氨基酸)
WP_232545483.1	菌毛蛋白	菌毛小亚基 StfF;FimA 超家族
WP_232545495.1	菌毛蛋白	FimA 超家族
WP_038441338.1	菌毛蛋白	未检出
WP_169951714.1	一型菌毛蛋白	长极性菌毛蛋白;FimA
WP_057959900.1	一型菌毛蛋白	菌毛蛋白;暂定 lpfA;FimA
WP_169954308.1	菌毛蛋白	主要菌毛蛋白 StkA
WP_220172410.1	一型菌毛蛋白	长极性菌毛蛋白 LpfA;FimA 超家族
WP_057960153.1	菌毛蛋白	FimA 超家族
WP_220172431.1	一型菌毛蛋白	FimA
WP_216312332.1	菌毛蛋白	FimA 超家族;菌毛组装蛋白
WP_169960242.1	一型菌毛主要亚基 FimA	FimA 超家族
WP_170044097.1	CS1 型菌毛主要亚基	菌毛_CS1 超家族
WP_057440050.1	菌毛蛋白	菌毛亚基 SteE
WP_177083923.1	鞭毛基体 L-环蛋白 FlgH	FlgH
WP_057438793.1	鞭毛钩相关蛋白 FlgK	FlgK

表 2 荧光假单胞菌 PF08 分泌酶类及其保守结构域

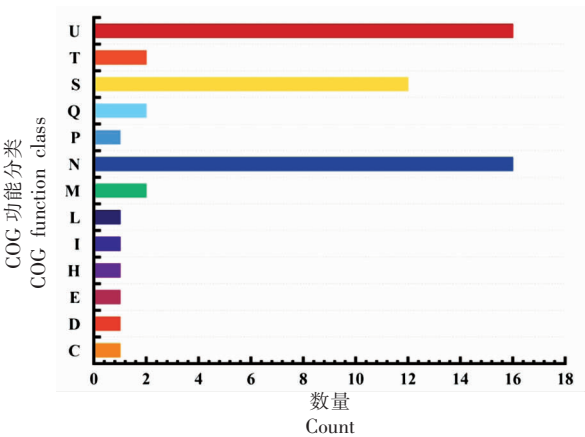
Table 2 Secretory enzymes and their conserved domains of *P. fluorescens* PF08

编号	Nr 功能注释	酶类型	保守结构域(比例:100 个氨基酸)
WP_234451233.1	M91 家族锌金属肽酶	水解酶	肽酶 M91 家族
WP_090221466.1	PhoX 家族磷酸酶	水解酶	Phox 家族
WP_169990481.1	组氨酸磷酸酶家族蛋白	水解酶	未检出
WP_164487686.1	内切酶 I 家族蛋白	水解酶	EndA
WP_198817859.1	C13 家族肽酶	水解酶	肽酶 C13 家族
WP_232545455.1	肽聚糖 dd-金属内肽酶家族蛋白	水解酶	nlpD 超家族
WP_057959274.1	类胰蛋白酶丝氨酸蛋白酶	水解酶	Tryp_SPc,胰蛋白样肽酶结构域
WP_170059957.1	YgcG 家族蛋白	水解酶	TPM_磷酸酶超家族
WP_038445448.1	beta-酮脂酰-ACP 合酶	合成酶	beta-酮脂酰-ACP 合酶
WP_186625699.1	谷氨酰胺合成酶	合成酶	未检出
WP_150719393.1	苹果酸脱氢酶(醌)	氧化还原酶	膜相关酶,苹果酸:醌氧化还原酶
WP_120732100.1	邻氨基苯甲酸盐转磷酸核糖基酶	转移酶	trpD,邻氨基苯甲酸盐转磷酸核糖基酶

beta-酮脂酰-ACP 合酶和谷氨酰胺合成酶。另外还注释到苹果酸酐氧化还原酶, 及色氨酸合成途径有关的邻氨基苯甲酸盐转磷酸核糖基酶。

2.6.2 荧光假单胞菌分泌蛋白的 COG 注释 分泌蛋白的 COG 功能分析表明,66 个经典分泌蛋白中 42 条序列可以被 eggno-map 数据库注释到具体的功能, 在 26 个功能类别中共注释到 13 个功能类别。结果见图 3。细胞内运输、分泌和囊泡运输(U),细胞运动性(N)功能各注释到 16 条蛋白,是注释到最多的 COG 功能分类。其次是未知功能蛋白(S 类)注释到 12 条蛋白。这与 Nr 数据库的注释结果相似。其余还注释到信号转导,次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢,无机离子的转运与代谢,细胞壁/膜/生物包膜,氨基酸代谢相关,复制、重组和修复,I,脂质转运与代谢;H,辅酶转运和代谢;E,氨基酸的转运和代谢 D,控制细胞周期、细胞分裂、染色体分割,能量产生和转化等生物功能。荧光假单胞菌分泌蛋白注释到的功能类别具有多样性,表明其分泌蛋白参与了荧光假单胞菌多项重要生命活动。

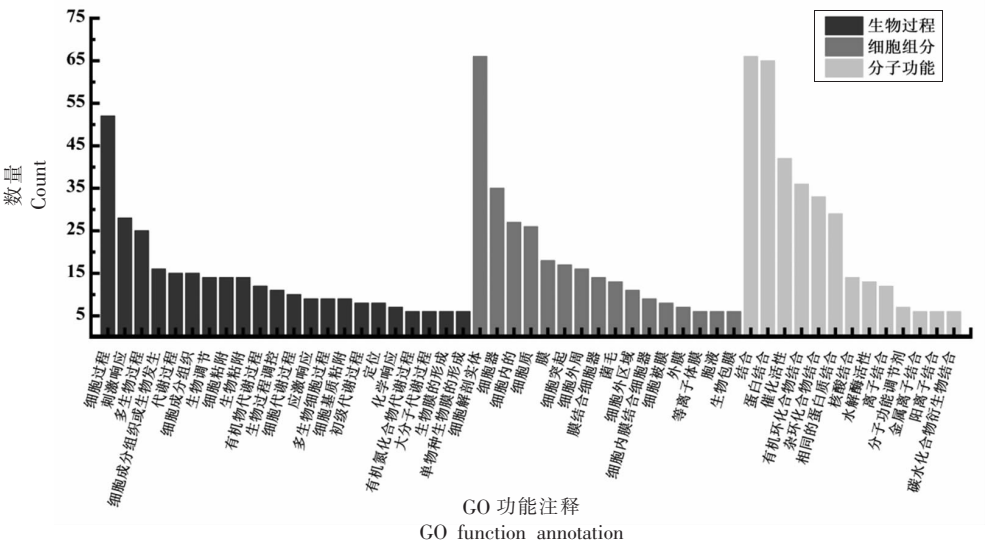
2.6.3 荧光假单胞菌分泌蛋白的 GO 注释 为进一步分析荧光假单胞菌 PF08 的分泌蛋白组的功能,66 个分泌蛋白经 GO 注释被分配到 3 个 GO 类别中,即生物过程,细胞成分和分子功能(图 4)。在这三大功能类别中,生物过程类别注释到的蛋白最多,涉及到的细胞过程、刺激响应、多生物过程、细胞组成组织或生物发生、代谢过程、细胞



注:U,细胞内运输,分泌和囊泡运输;T,信号转导;S,功能未知;Q,次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢;P,无机离子的转运与代谢;N,细胞运动性;M,细胞壁、膜、生物包膜;L,复制、重组和修复;I,脂质转运与代谢;H,辅酶转运和代谢;E,氨基酸的转运和代谢 D,控制细胞周期、细胞分裂、染色体分割;C,能量产生和转移。

图 3 荧光假单胞菌 PF08 分泌蛋白的 COG 注释
Fig.3 COG Notes on secreted proteins
of *Pseudomonas fluorescens* PF08

成分组织、生物调节、细胞黏附、生物黏附等类别具有高度代表性。在细胞组分分类中,细胞结构体、细胞器、细胞内的组分、细胞质、细胞突起、细胞外周、膜结合细胞器、菌毛、胞外区域等是注释丰度较高的类别。在分子功能本体中,与结合功能、蛋白质结合、催化活性、有机环化合物结合、杂



环化合物结合、同源蛋白质结合、核酸结合和水解酶活性等有关的蛋白质最为丰富。因此,结合 Nr、COG 和 GO 注释结果表明,荧光假单胞菌的分泌蛋白组由不同性质的蛋白质组成,可能在促进荧光假单胞菌的胞外定殖、生物被膜形成、降解食品组分以获取营养物质等方面发挥作用。

3 结论

鱼源荧光假单胞菌 PF08 具有较强胞外蛋白分泌能力,其全基因组所编码的 5514 条蛋白质序列中,共筛选出 66 个经典分泌蛋白,占全基因组的 1.20%,均经 Sec 分泌途径分泌。这些分泌蛋白多为小分子蛋白,其长度大多在 101~400 个氨基酸之间,氨基酸组成以疏水性氨基酸为主。通过 Nr、COG 和 GO 功能注释分析,这些经典分泌蛋白大部分为菌毛蛋白、酶类、鞭毛蛋白、DUFs 家族蛋白及假定蛋白等功能蛋白。其中,未知功能假定蛋白含量最多,其次是菌毛蛋白和水解酶类。荧光假单胞菌的分泌蛋白组由不同性质的蛋白质组成,可能在促进荧光假单胞菌的胞外定殖、生物被膜形成、降解食品组分以获取营养物质等方面发挥作用。本研究初步分析鱼源荧光假单胞菌经典分泌途径的胞外蛋白,然而对于非经典分泌蛋白,不同细菌差异较大,在后续的研究中需要结合蛋白质组学等其它技术进行鉴定,并对不同环境下荧光假单胞菌分泌蛋白的实际表达情况进行研究,从根本上了解荧光假单胞菌分泌蛋白的表达特征及生物学功能,从分子层面更全面地揭示荧光假单胞菌致腐机制。

参 考 文 献

- [1] CHEN J, SUN Z H, JIN J M, et al. Role of siderophore in *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation and spoilage potential function[J]. Food Microbiology, 2023, 109: 104151.
- [2] SHU H Z, ZHANG W M, YUN Y H, et al. Metabolomics study on revealing the inhibition and metabolic dysregulation in *Pseudomonas fluorescens* induced by 3-carene [J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127220.
- [3] XU J X, LI Q Y, ZHANG J Y, et al. In silico structural and functional analysis of cold shock proteins in *Pseudomonas fluorescens* PF08 from marine fish[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(8): 1446-1454.
- [4] LIU X X, JI L, WANG X, et al. Role of RpoS in stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 270: 31-38.
- [5] GUO M, TAN S Q, ZHU J L, et al. Genes involved in biofilm matrix formation of the food spoiler *Pseudomonas fluorescens* PF07 [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 881043.
- [6] VENUGOPAL V. Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: A review[J]. Journal of Food Protection, 1990, 53(4): 341-350.
- [7] 王帅涛, 高倩倩, 成娟丽, 等. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受群体感应系统和 C-di-GMP 调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1106-1122.
- [8] WANG S T, GAO Q Q, CHENG J L, et al. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by quorum sensing systems and C-di-GMP[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1106-1122.
- [9] ZHANG W P, SUN J, DING W, et al. Extracellular matrix-associated proteins form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5: 40.
- [10] DAS T, MANOHARAN A, WHITELEY G, et al. Chapter 3-*Pseudomonas aeruginosa* biofilms and infections: Roles of extracellular molecules // New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Microbial biofilms [M]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020: 29-46.
- [11] HEYWOOD A, LAM I L. Cell envelope proteases and peptidases of *Pseudomonas aeruginosa*: Multiple roles, multiple mechanisms [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(6): 857-873.
- [12] FREUDL R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 52.
- [13] TSIRIGOTAKI A, DE GEYTER J, ŠOŠTARIĆ N, et al. Protein export through the bacterial Sec pathway[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(1): 21-36.
- [14] WANG Y, HAN X, CHEN X, et al. Potential

- harmful of extracellular proteases secreted by *Pseudomonas fluorescens* W3 on milk quality[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(3): e15192.
- [14] 邢启凯, 李铃仙, 曹阳, 等. 可可毛色二孢全基因组分泌蛋白的预测及分析[J]. 中国农业科学, 2020, 53(24): 5027–5038.
- XING Q K, LI L X, CAO Y, et al. Prediction and analysis of candidate secreted proteins from the genome of *Lasiodiplodia theobromae*[J]. China Agriculture Science, 2020, 53(24): 5027–5038.
- [15] BASHYAL B M, RAWAT K, SHARMA S, et al. Whole genome sequencing of *Fusarium fujikuroi* provides insight into the role of secretory proteins and cell wall degrading enzymes in causing bakanae disease of rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2013.
- [16] 臧睿, 宋璐璐, 尹新明, 等. 葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*) 全基因组分泌蛋白的预测及功能分析[J]. 植物病理学报, 2021, 51(4): 559–571.
- ZANG R, SONG L L, YIN X M, et al. Genome-wide prediction and analysis of the secreted proteins of *Botryosphaeria dothidea*[J]. Journal of Plant Pathology, 2021, 51(4): 559–571.
- [17] AIMAGRO ARMENTEROS J J, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(4): 420–423.
- [18] YU C S, LIN C J, HWANG J K. Predicting sub-cellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions[J]. Protein Science, 2004, 13(5): 1402–1406.
- [19] HALLGREN J, TSIRIGOS K D, PEDERSEN M D, et al. Deep TMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks [EB/OL]. (2022-04-08) [2023-01-18]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.08.487609v1>.
- [20] G?SLASON M H, NIELSEN H, ARMENTEROS J J A, et al. Prediction of GPI-anchored proteins with pointer neural networks [J]. Current Research in Biotechnology, 2021, 3: 6–13.
- [21] HUERTA-CEPAS J, FORSLUND K, COELHO L P, et al. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper[J]. Molecular Biology and Evolution, 2017, 34(8): 2115–2122.
- [22] WANG S J, YOU R H, LIU Y J, et al. NetGO 3.0: Protein language model improves large-scale functional annotations[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2023, 21(2): 349–358.
- [23] 覃悦, 祝友朋, 韩长志. 基于全基因组序列的黄单胞菌分泌蛋白质预测及其特征分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 53–59.
- QIN Y, ZHU Y P, HAN C Z. Prediction and characteristic analysis of *Xanthomonas campestris* secretory protein based on whole genome sequence[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2021, 37(1): 53–59.
- [24] PALLERONI N J. Introduction to the family *Pseudomonadaceae*[J]. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 1992, 3: 3074–3085.
- [25] MAFFEI B, FRANCETIC O, SUBTIL A. Tracking proteins secreted by bacteria: What's in the toolbox? [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 221.
- [26] MUSIK J E, ZALUCKI Y M, BEACHAM I R, et al. The role of signal sequence proximal residues in the mature region of bacterial secreted proteins in *E. coli* [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2022, 1864(10): 184000.
- [27] DALBEY R E, KUHN A. Protein traffic in Gram-negative bacteria—how exported and secreted proteins find their way[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(6): 1023–1045.
- [28] 肖峰. Alpha 螺旋跨膜蛋白 3D 结构中的残基可接触性预测研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- XIAO F. Prediction of residue accessibility in the 3D structure of alpha helical transmembrane protein [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015.
- [29] NAKATSUKASA K. Potential physiological relevance of ERAD to the biosynthesis of GPI-anchored proteins in yeast[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 1061.
- [30] ZURZOLO C, SIMONS K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2016, 1858(4): 632–639.
- [31] 罗成科, 肖国举, 李明. 不同未知功能结构域蛋白家族(DUFs)基因在植物中的生物学功能[J]. 植物生理学报, 2015, 51(2): 153–158.

- LUO C K, XIAO G J, LI M. Biological functions of different unknown functional domain protein families (DUFs) genes in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(2): 153–158.
- [32] LV P Y, WAN J L, ZHANG C T, et al. Unraveling the diverse roles of neglected genes containing domains of unknown function (DUFs): Progress and perspective[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 4187.
- [33] LING H L, RAHMAT Z, BAKAR F D A, et al. Secretome analysis of alkaliphilic bacterium *Bacillus lehensis* G1 in response to pH changes[J]. *Microbiological Research*, 2018, 215: 46–54.
- [34] MUHAMMAD M H, IDRIS A L, FAN X, et al. Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 928.
- [35] TERAHARA N, KRULWICH T A, ITO M. Mutations alter the sodium versus proton use of a *Bacillus clausii* flagellar motor and confer dual ion use on *Bacillus subtilis* motors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(38): 14359–14364.
- [36] YU D W, ZHAO W Y, WAN X Y, et al. The protective pattern of chitosan-based active coating on texture stabilization of refrigerated carp fillets from the perspective of proteolysis[J]. *Food Chemistry*, 2023, 404: 134633.

Genome-wide Prediction and Functional Analysis of Secretory Protein of *Pseudomonas fluorescens* from Fish

Li Qiuying^{1,2}, Zhang Xueting^{1,2}, Cui Fangchao^{1,2}, Tan Xiqian^{1,2}, Sun Tong^{1,2}, Li Jianrong^{1,2*}

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

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

Abstract Objective: *Pseudomonas fluorescens* is a dominant spoilage bacterium in refrigerated Marine fish. Its strong ability of extracellular protein secretion is one of the important factors leading to fish spoilage. Thus, extracellular protein composition and secretion pathway under the whole genome level of *P. fluorescens* from fish are explored. Methods: A variety of bioinformatics analysis software was used to predict the extracellular protein secretion of *P. fluorescens* PF08 from fish and to analyze its function. Results: In the 5 514 proteins encoded by *P. fluorescens* PF08 in the whole genome, sixty-six classical secreted proteins with Sec/SPI type signal peptides, localized extracellular, with none or only one transmembrane structure and no GPI anchor site were screened. Most proteins were 101–400 amino acids, small molecular proteins, and the proportion of hydrophobic amino acids was the highest. 13 pili proteins, 11 enzymes, 2 flagellins, 7 DUFs family proteins, 17 unknown functional hypothesized proteins and 16 other functional proteins were annotated by Nr database. Further through COG analysis, these proteins were mainly annotated into the functional categories of intracellular transport, secretion and vesicle transport, cell motility, signal transduction and cell wall, membrane and biological envelope. GO annotation showed that these proteins were highly annotated in the three categories of biological processes, cell components and molecular functions. Conclusion: The secretory proteome of *P. fluorescens* consisted of different functional and properties proteins, involving key proteins that promote the extracellular colonization, biofilm formation, decomposition of food components, etc. It provides an important basis for further research on the spoilage mechanisms of *P. fluorescens* in fish.

Keywords *Pseudomonas fluorescens*; secretory protein; bioinformatics; spoilage